

DEX - 0315

BK

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日

2001年12月20日 (20.12.2001)

PCT

(10) 国際公開番号

WO 01/96401 A1

(51) 国際特許分類⁷:
C12N 15/09 // C12P 21/08

C07K 16/00,

(MORINO, Kazuhiko) [JP/JP]; 〒470-1123 愛知県豊明市西川町笹原21-14 ソレアード笹原301号 Aichi (JP). 赤堀 泰 (AKAHORI, Yasushi) [JP/JP]; 〒468-0056 愛知県名古屋市天白区島田5-1508 Aichi (JP). 伊庭善孝 (IBA, Yoshitaka) [JP/JP]; 〒458-0002 愛知県名古屋市緑区桃山3-513 サニーレジデンス101号 Aichi (JP). 篠原みどり (SHINOHARA, Midori) [JP/JP]; 〒470-1131 愛知県豊明市二村台2-14-12 青山ハイツ303号 Aichi (JP). 鶴飼由範 (UKAI, Yoshinori) [JP/JP]; 〒470-1101 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪1-100 エクセル二村台1-F号 Aichi (JP). 黒澤良和 (KUROSAWA, Yoshikazu) [JP/JP]; 〒465-0075 愛知県名古屋市名東区藤巻町3-2-1271 Aichi (JP).

(21) 国際出願番号:

PCT/JP01/04964

(22) 国際出願日: 2001年6月12日 (12.06.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-178880 2000年6月14日 (14.06.2000) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社 医学生物学研究所 (MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.) [JP/JP]; 〒460-0002 愛知県名古屋市中区丸の内三丁目5番10号 住友商事丸の内ビル5階 Aichi (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 森野和彦

(74) 代理人: 小西富雅, 外 (KONISHI, Tomimasa et al.); 〒460-0002 愛知県名古屋市中区丸の内二丁目17番12号丸の内エステートビル7階 Aichi (JP).

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,

[統葉有]

(54) Title: METHOD OF CONSTRUCTING scFv ANTIBODY FUSED WITH FLUORESCENT PROTEIN

(54) 発明の名称: 蛍光タンパク質を融合したscFv抗体の作製方法

(57) Abstract: A method of constructing an scFv antibody having a fluorescent protein fused therewith and showing an activity of binding to an antigen. An scFv antibody library composed of phage clones with the expression of scFv antibody on the surface is prepared. From this library, a clone expressing an antibody recognizing a specific antigen is screened. Then, an scFv gene is obtained from this clone and transferred into an expression vector in which a gene encoding a fluorescent protein has been preliminarily integrated. By expressing the vector in a host, an scFv antibody having the fluorescent protein fused therewith can be produced.

(57) 要約:

蛍光タンパク質を融合し、かつ抗原結合活性のある scFv 抗体の作製方法を提供する。

scFv 抗体を表面に発現しているファージクローンにより構成される scFv 抗体ライブラリーを調製し、これより特定の抗原を認識する抗体を発現しているクローンを選択する。そして、当該クローンより、scFv 抗体遺伝子を取得し、これを発現ベクターに導入する。発現ベクターには予め蛍光タンパク質をコードする遺伝子が組込まれており、宿主内で発現させることにより、蛍光タンパク質を融合した scFv 抗体が産生される。

WO 01/96401 A1

2180 - X30

WO 01/96401 A1



IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL,
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 國際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

- (84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,

明細書

蛍光タンパク質を融合した scFv 抗体の作製方法

5 技術分野

本発明は、蛍光を発することができる抗体の作製方法に関する。詳しくは、蛍光タンパク質を融合した scFv 抗体の作製方法に関する。

背景技術

10 抗体のライブラリーの作製方法としてファージディスプレイ法が利用されている。ファージディスプレイ法は、Smithにより 1985 年(Smith GP Science 1985 228:4075 1315-7)に考案されたもので、M13 ファージのような一本鎖環状 DNA を持つ線状のバクテリオファージが用いられる。ファージ粒子は DNA の周囲を取り囲んでファージ粒子の大部分を構成する cp8 というタンパク質と、ファージ 15 が大腸菌に感染する時に機能する 5 個の cp3 と呼ばれるタンパク質などからなっている。この cp3 もしくは cp8 と融合した形でポリペプチドをコードするように遺伝子を構築し、ファージ粒子表面にそのタンパクを発現させるシステムがファージディスプレイシステムである。他の物質との結合活性を持つタンパク質を表面に保持したファージ粒子は、そのリガンドとの結合活性を利用して濃縮するこ 20 とができる。こうして目的とする結合活性を有するファージ粒子を濃縮する方法は、パニング法と呼ばれている。濃縮されたファージ粒子には、必要な結合活性を持つタンパク質をコードする DNA がパッケージングされている。このように繊維状ファージの利用によって、結合活性に基づくスクリーニングと、DNA のクローニングとをきわめて効率的に行うことができるシステムが実現した 25 (McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Nature. 1990 348: 630

1552-4.)。

ファージディスプレイ系が抗体に応用され、VH ドメインのみ、scFv、Fv、Fab 型抗体が cp3 又は cp8 と融合された形で発現された。抗原と結合するファージ抗体は同時に抗体をコードする遺伝子を含む。即ち、ファージディスプレイシステムでは、特定の抗原に結合可能な抗体分子と、その抗体分子をコードする遺伝子も同時に得られる点に大きな利点がある。しかし、ファージディスプレイ系を用いて作製された初期の抗体ライブラリーから単離された抗体は、抗原結合力の低いもののが多かった。結合力を高める試みの一つとして、人為的に遺伝子に変異を与える方法が提案された。Winter らは 1994 年、単離した全ての VH、VL 遺伝子と、JH、JL 遺伝子の間にランダムな配列を挿入する半人工的配列を持つ抗体ライブラリーを作製することにより、親和性に優れた抗体の取得を可能とする抗体ライブラリーを得た(Nissim A, Winter G et al. EMBO J. 13:3 692-8, 1994)。De Kruif らも 1995 年基本的に同じ原理に基づいて抗体ライブラリーを作製している(de Kruif J, Boel E, Logtenberg T J. Mol. Biol. 248:1 97-105, 1995)。

Vaughan らは、1996 年ライブラリーの大きさを拡大することで充分な大きさの抗体レパートリーを確保しようとしている(Vaughan TJ et al. Nat. Biotechnol. 14:3 309-14, 1996)。また、本発明者らは、生体内における抗体産生過程をできるだけ再現することにより、より多様なレパートリーを有し、かつ機能的なコンフォーメーションを保持した抗体分子を高い割合で含む抗体ライブラリーの提供方法を提案した（特願平 12-050543）。

上記のように、ファージディスプレイシステムによれば、抗体分子だけでなく、その抗体分子をコードする遺伝子も同時に得られる。この遺伝子の両端はユニークな制限酵素部位に設計できるため、ファージDNAを単離し、制限酵素処理を行い、続いて、適当な発現ベクターに組み込むといった簡単な操作により、当該遺伝子の発現形態をファージディスプレイ型から別の形態へと変換することがで

きる (Ito,W.,and Kurosawa,Y.: J.Biol.Chem.268:20668-20675,1993)。

一方、蛍光を発することができるタンパク質 G F P (green fluorescent protein) が知られ、G F P による様々なタンパク質の標識化が試みられている。G F P は、特定波長の光の照射により蛍光を発することができるタンパク質分子であり、G
5 F P により標識化されたタンパク質分子の検出には特別の試薬等を必要としない。
したがって、迅速かつ容易に検出ができるることはもちろんのこと、生細胞内等においても直接検出することができるといった利点があり、今後の応用が期待されている。なお、G F P と同様に蛍光を発するタンパク質として、R F P (red fluorescent protein)、B F P (blue fluorescent protein)、Y F P (yellow fluorescent
10 protein) C F P (cyan fluorescent protein) や、これらの変異体が開発されている (Crameri,A. et al. : Nature Biotechnol., 14 : 315-319, 1996 ; Yang,T. et al.: J. Biol. Chem., 273 : 8212-8216, 1998; Lybarger, L. et al.: Cytometry, 31:147-152, 1998)。

抗体分子についても G F P 等による標識化が検討されているが、以下の課題が存在することが指摘されている。

15 抗体分子の中の S-S 結合には、ドメイン内の分子内 S-S 結合と、H鎖とL鎖の間、あるいは H 鎖と H 鎖の間の分子間 S-S 結合の 2 種類が存在する。バクテリアの細胞質内で発現させた抗体は、抗体の産生に組替え遺伝子技術を応用した当初は、抗原結合活性をあまり示さなかった。というのは、細胞質内の条件では、ポリペプチドの正しい folding が起きないうえ、S-S 結合が正しく形成されない
20 からである (Boss MA, Kenten JH, Wood CR, Emtage JS. Nucleic Acids Res. 12 : 3791-806, 1984.)。これに対して、翻訳されたポリペプチドが膜を通過しベリプラズムへ分泌されるように、pelB 配列や ompA 配列をポリペプチドの N 末端側に導入するという試みが行われたが、Fab フラグメント, scFv フラグメントのいずれも抗原との結合が正しく行われるものは得られなかつた (Skerra,A.,
25 and Pluckthun,A.: Science 240:1038-1041, 1988; Better,M., Chang, C. P.,

Robinson, R. R., and Horwitz, A. R. :Science 240:1041-1043, 1988)。 GFP と融合することによって蛍光を発する抗体を創り出すには、抗体が抗原結合活性を得るために必要な条件と GFP が蛍光を発するために必要な条件という相反する両方の条件を満たさなければならない。GFP は、バクテリア内で翻訳された直後 5 の状態では蛍光を発することができない。別の因子は必要としないが、分子内で多段階の化学反応が起きることにより発光中心が形成されることで蛍光を発することができる状態となる (Reid,B., and Flynn,G.C.:Biochemistry 36:6786-6791,1997)。

一方、最近になって、イントラボディー技術の発展により、抗原結合能を有する scFv 抗体を動物細胞の細胞質内でうまく発現させることができるようになって 10 きた。

発明の開示

このような状況において、本発明者らは、scFv 抗体に注目し、scFv 抗体を蛍光タンパク質分子により標識化することを試みた。その結果、ファージディスプレイシステムを組み合わせて用いた系により、蛍光タンパク質により標識化された scFv 抗体を得ることに成功し、本発明を完成するに至った。本発明の構成は以下の通りである。

- [1] 以下の工程を含む、蛍光タンパク質を融合した scFv 抗体の作製方法。
 - 20 1) scFv 抗体をその表面に発現しているファージクローンにより構成される scFv 抗体ライブラリーを調製する工程、
 - 2) 前記 scFv 抗体ライブラリーを抗原でスクリーニングすることにより、該抗原に結合可能な scFv 抗体を発現しているファージクローンを選択する工程、
 - 3) 工程 2) で選択したファージクローンより、scFv 抗体をコードする遺伝子 25 を取得する工程、

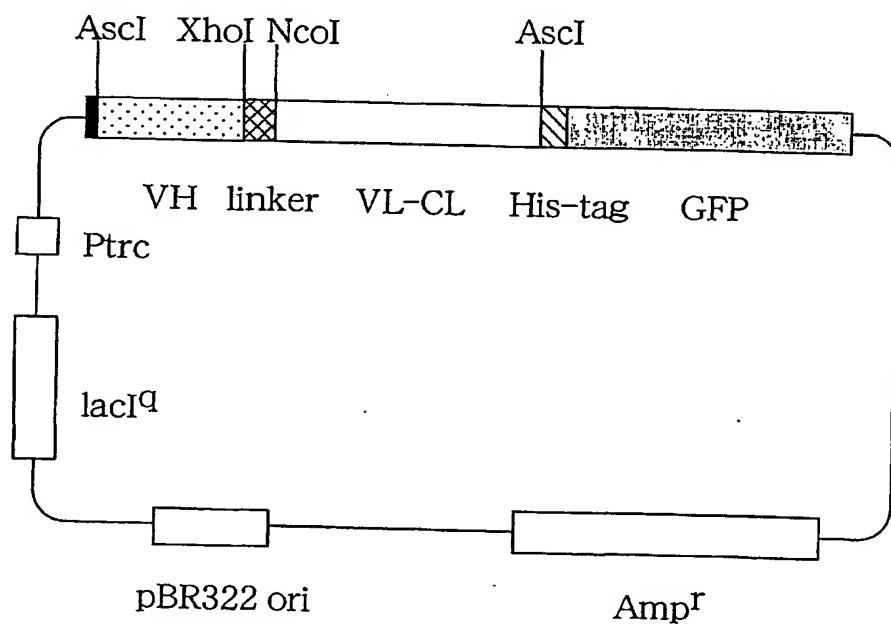
- 4) 工程 3) で取得した遺伝子を組込むことにより該遺伝子の発現産物と蛍光タンパク質との融合タンパク質を発現可能な発現ベクターに、該遺伝子を組込む工程、及び
- 5) 工程 4) で得られた組換えベクターを用いて宿主を形質転換し、前記融合 5 タンパク質を発現させる工程。
- 〔2〕 前記 scFv 抗体ライブラリーは、重鎖可変領域と機能的なコンフォーメーションを再構成するように選択された軽鎖可変領域を少なくとも一部分含んで成る、ことを特徴とする〔1〕に記載の scFv 抗体の作製方法。
- 〔3〕 前記 scFv 抗体ライブラリーを構成する各ファージクローン表面の scFv 10 抗体は、VH 領域、VL 領域、リンカー及び CL 領域を有する、ことを特徴とする〔1〕又は〔2〕に記載の scFv 抗体の作製方法。
- 〔4〕 前記蛍光タンパク質は、GFP、RFP、BFP、YFP、CFP、及びこれらの変異体の中から選択される 1 又は 2 以上の蛍光タンパク質である、ことを特徴とする〔1〕乃至〔3〕のいずれかに記載の scFv 抗体の作製方法。
- 15 〔5〕 〔1〕乃至〔4〕のいずれかに記載の方法により作製される、蛍光タンパク質を融合した scFv 抗体。
- 〔6〕 VH 領域、VL 領域、及びリンカーにより構成される Fv 領域、CL 領域、並びに該 Fv 領域に該 CL 領域を介して連結される蛍光タンパク質を有してなる、ことを特徴とする蛍光タンパク質を融合した scFv 抗体。
- 20 〔7〕 前記蛍光タンパク質は、GFP、RFP、BFP、YFP、CFP 及びこれらの変異体の中から選択される 1 又は 2 以上の蛍光タンパク質である、ことを特徴とする〔6〕に記載の scFv 抗体。
- 〔8〕 〔5〕乃至〔7〕のいずれかに記載の scFv 抗体を用いた免疫学的測定方 25 法。
- 25 〔9〕 〔1〕に記載の工程 1) ~ 4) により取得される、scFv 抗体遺伝子、及

び蛍光タンパク質をコードする塩基配列を有する組換えベクター。

[10] 前記 scFv 抗体遺伝子は VH 遺伝子、リンカー配列、VL 遺伝子、及び CL 遺伝子からなる、ことを特徴とする [9] に記載の組換えベクター。

[11] 前記蛍光タンパク質は、GFP、RFP、BFP、YFP、CFP 及びこれらの変異体の中から選択される 1 又は 2 以上の蛍光タンパク質である、ことを特徴とする [9] 又は [10] のいずれかに記載の組換えベクター。

[12] 以下の構造を有する組み換えベクター。



[13] 5' 側より順に、開始コドン、scFv 抗体遺伝子を導入する部位、及び
10 蛍光タンパク質をコードする塩基配列を有する発現ベクター。

[14] 前記 scFv 抗体遺伝子は、VH 遺伝子、リンカー配列、VL 遺伝子、及び CL 遺伝子からなる、ことを特徴とする [13] に記載の発現ベクター。

[15] 前記 scFv 抗体遺伝子を導入する部位と前記蛍光タンパク質をコードする塩基配列との間に His-tag、myc-tag、又は HA-tag をコードする塩基配列を有する、ことを特徴とする [13] 又は [14] に記載の発現ベクター。

〔16〕 前記蛍光タンパク質は、GFP、RFP、BFP、YFP、CFP及びこれらの変異体の中から選択される1又は2以上の蛍光タンパク質である、ことを特徴とする〔13〕乃至〔15〕のいずれかに記載の発現ベクター。

〔17〕 scFv 抗体をその表面に発現しているファージクローンにより構成され
5 る scFv 抗体ライブラリー、及び

scFv 抗体遺伝子を組み込むことにより該遺伝子の発現産物と蛍光タンパク質との融合タンパク質を発現可能なベクター、を含む、蛍光タンパク質を融合した
scFv 抗体作製用キット。

〔18〕 前記 scFv 抗体は VH 領域、VL 領域、リンカー、及び CL 領域から構
10 成される、ことを特徴とする〔17〕に記載のキット。

〔19〕 scFv 抗体遺伝子を有するファージクローン又はファージミドクローン
から構成される scFv 抗体遺伝子ライブラリー、及び
scFv 抗体遺伝子を組み込むことにより該遺伝子の発現産物と蛍光タンパク質との融合タンパク質を発現可能なベクター、を含む、蛍光タンパク質を融合した
15 scFv 抗体作製用キット。

〔20〕 前記 scFv 抗体遺伝子は VH 遺伝子、VL 遺伝子、リンカー配列、及び
CL 遺伝子から構成される、ことを特徴とする〔19〕に記載のキット。

〔21〕 前記ベクターは〔13〕乃至〔16〕のいずれかに記載される発現ベ
クターである、ことを特徴とする〔17〕乃至〔20〕のいずれかに記載のキッ
20 ツ。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の実施例において、可変領域ライブラリーの作製に用いた各種のベクターの構造を模式的に示す図である。

25 1) pAALFab : D1.3 mutation 用ベクター。

- 2) pFCAH3-E8T: E8 発現用ベクター。pAALFab をもとに、制限酵素サイトを改変した。新たに PstI、XbaI、および KpnI サイトを付加し、EcoRI、および XhoI サイトの位置を変更した。
- 3) pFvCA-E8VHd: 重鎖可変領域遺伝子クローニング用ベクター。pFCAH3-E8T をもとに、制限酵素サイトを改変した。XbaI-EcoRI 間を欠落させ、新たに KpnI、SfiI、NcoI、および SpeI サイトを付加した。重鎖可変領域遺伝子を SfiI-XhoI サイトにクローニング可能。
- 4) pFCAH9-E8d: 重鎖可変領域遺伝子クローニング用ベクター。pFCAH3-E8T、および pFvCA-E8VHd をもとに DNA 配列を改変した。マウス γ CH1 をヒト γ CH1 で置きかえた。新たに、SfiI、NcoI、および AscI サイトを付加した。軽鎖可変領域を SfiI-AscI サイトにクローニング可能。
- 図 2 は、pFCAH9-E8d のインサートの塩基配列を示す図である。
- 図 3 は、pFCAH9-E8d のインサートの制限酵素サイトと塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を示す図（1）。
- 図 4 は、pFCAH9-E8d のインサートの制限酵素サイトと塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を示す図（2）。
- 図 5 は、pFCAH9-E8d のインサートの制限酵素サイトと塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を示す図（3）。
- 図 6 は、pscFvCA-E8VHd のインサートの塩基配列を示す図である。
- 図 7 は、pscFvCA-E8VHd のインサートの制限酵素サイトと塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を示す図（1）。
- 図 8 は、pscFvCA-E8VHd のインサートの制限酵素サイトと塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を示す図（2）。
- 図 9 は、scFv-CL 抗体遺伝子ライブラリーの調製に用いたベクター scNcopFCAH9-E8VHdVLd の構造を模式的に示した図。

図 1 0 は、scNcopFCAH9-E8VHdVLd のインサート部の塩基配列及びそれにコードされるアミノ酸配列を示す図（1）。

図 1 1 は、scNcopFCAH9-E8VHdVLd のインサート部の塩基配列及びそれにコードされるアミノ酸配列を示す図（2）。

5 図 1 2 は、scNcopFCAH9-E8VHdVLd のインサート部の塩基配列及びそれにコードされるアミノ酸配列を示す図（3）。

図 1 3 は、本発明の実施例における操作手順を示した図。a) に示すのは、AIMS-5 ライブラリーを構成するクローニングにおける cp3 融合型 scFv-CL 抗体の遺伝子の模式図。b) に示すのは、PCR によって scFv-CL 抗体のコードされた領域の DNA を増幅し、PCR 産物を pAscHGFP ベクターに組み込むことを表す模式図。b) の上段に PCR 産物（増幅された scFv-CL 抗体遺伝子）、同下段に pAscHGFP ベクターが表される。c) に示すのは、b) の操作により得られる、GFP 融合型 scFv-CL 抗体発現用ベクターである。

15 図 1 4 は、scFv(CC046N2)-CL-GFP の DNA 配列およびアミノ酸配列。メチオニンを含む 3 アミノ酸のあとに、VH ドメイン-リンカー-V λ ドメイン-C λ ドメイン-His-tag-GFP という順に並んでいる構造となっている。V ドメインの番号および CDR の位置については、Kabat の決め方に従った。V λ ドメインの 10 番目のアミノ酸は欠失している。

20 図 1 5 は、大腸菌で発現させた GFP 融合型 scFv-CL 抗体を SDS-PAGE にて解析した結果（ゲル）を示す図である。レーン M は分子量マーカーを、レーン 1 は粗抽出液を、レーン 2 は精製タンパク質をそれぞれ流した結果である。染色は、クーマシーブリリアントブルーで行った。矢印は、GFP 融合型 scFv-CL 抗体の位置を示す。

25 図 1 6 は、C.elegans の初期胚を、CC046 に特異的な 2 種類の形態の scFv-CL 抗体で染色した図。a) は GFP 融合型 scFv-CL-GFP で直接染色した図（矢印 A

で示した部分に GFP の蛍光が観察される。また、矢印 d で示した部分には DAPI による蛍光が観察される)。b) は、cp3 融合型 scFv-CL 抗体を反応させた後、2 次抗体 (ウサギ抗 cp3 抗体) と 3 次抗体 (Cyanin3 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体) を反応させて検出した図(矢印 B で示した部分に Cyanin3 の蛍光が観察される)。

- 5 また、矢印 D で示した部分には DAPI による蛍光が観察される。)。

発明を実施するための最良の形態

本発明である、蛍光タンパク質を融合した scFv 抗体の作製方法は、以下の工程を含むものである。

- 10 1) scFv 抗体をその表面に発現しているファージクローンにより構成される scFv 抗体ライブラリーを調製する工程、
2) 前記 scFv 抗体ライブラリーを抗原でスクリーニングすることにより、該抗原に結合可能な scFv 抗体を発現しているファージクローンを選択する工程、
3) 工程 2) で選択したファージクローンより、scFv 抗体をコードする遺伝子
15 を取得する工程、
4) 工程 3) で取得した遺伝子を組込むことにより該遺伝子の発現産物と蛍光タンパク質との融合タンパク質を発現可能な発現ベクターに、該遺伝子を組込む工程、及び
5) 工程 4) で得られた組換えベクターを用いて宿主を形質転換し、前記融合
20 タンパク質を発現させる工程。

本発明において、「scFv 抗体」とは、Fv 領域、即ち、重鎖可変領域 (VH 領域) 及び軽鎖可変領域 (VL 領域) を含み、これらがリンカーにより架橋されて構成される抗体である。本明細書においては、VH 領域、VL 領域、及びリンカーに加えて、軽鎖定常領域 (CL 領域) を含むものも scFv 抗体に含まれるものとする。CL 領域
25 を付加することは、本発明の蛍光タンパク質を融合した scFv 抗体のコンフォー

メーションの安定化の目的で行われる。

また、「scFv 抗体遺伝子」とは、VH 領域をコードする遺伝子（VH 遺伝子）、VL 領域をコードする遺伝子（VL 遺伝子）、及びリンカー配列から構成される。本発明においては、これらに加えて CL 領域をコードする遺伝子（CL 遺伝子）を含む
5 ものも scFv 抗体遺伝子に含まれるものとする。

VH 領域と VL 領域とを架橋するリンカーには、汎用的なものを用いることができ、例えば、グリシンーセリンからなるペプチドリンカーが用いられる。

本発明において、「ライプラリー」とは、多様な同種の構成要素からなる集合体を意味する。よって、scFv 抗体ライプラリーとは、多様な scFv 抗体を含有する
10 集合体である。本発明においては、各 scFv 抗体はファージ表面に発現されている。換言すれば、表面に scFv 抗体を発現しているファージクローンの集合により scFv 抗体ライプラリーが形成される。

scFv 抗体ライプラリーは、重鎖可変領域と軽鎖可変領域が機能的なコンフォーメーションを再構成するように（もしくは、再構成しているものが大多数を占めるように）作製できれば有効なものとなる。本発明者らは、特願平 12-050
15 543において、重鎖可変領域と機能的なコンフォーメーションを形成する軽鎖可変領域を選択してライプラリー作製に用いることを提案している。特願平 12-050543 に提案された方法は scFv 抗体ライプラリーにも適用することが可能である。また、scFv 抗体ライプラリーは、生体内の多様性を包含するのに十分なクローン数を有することが好ましい。これにより、後述の工程 2)において、
20 多種多様な抗原に対して、当該抗原と結合可能な scFv 抗体を表面に発現するクローンを選択することが可能となる。また、クローン数は、 1×10^{11} 以上であることが好ましい。このようなクローン数を有する scFv 抗体ライプラリーの調製方法については、後述の実施例において説明する。
25 本発明における scFv 抗体ライプラリーは、scFv 抗体をその表面に発現してい

るファージクローンの集合により構成されるが、かかる scFv 抗体ライブラリーは scFv 抗体遺伝子を保有するファージミドクローンの集合（以下、「scFv 抗体ファージミドライブラリー」という）より調製することができる。なお、本発明において、scFv 抗体遺伝子を保有するクローンの集合から構成されるライブラリーを 5 scFv 抗体遺伝子ライブラリーと呼ぶ。したがって、scFv 抗体ファージミドライブラリーは scFv 抗体遺伝子ライブラリーでもある。また、scFv 抗体遺伝子を保有するファージミドにより形質転換された大腸菌の集合も scFv 抗体遺伝子ライブラリーを構成する。

scFv 抗体ファージミドライブラリーを作製するためのファージミドベクター 10 としては、市販のものを利用することができる（例えば、ファルマシア製 pTZ19R）。 ファージミドには、cp3 や cp8 等のファージの構成タンパク質をコードする遺伝子に、発現させたい外来タンパク質をコードする遺伝子、即ち、scFv 抗体遺伝子を連結する。

scFv 抗体遺伝子は、上述のように VH 遺伝子、VL 遺伝子、及びリンカー配列、 15 又はこれらに CL 遺伝子を加えたものから構成されるが、VH 遺伝子、VL 遺伝子、 及び CL 遺伝子は、任意の抗体産生細胞より得ることができる。抗体産生細胞としては、例えば、末梢血リンパ球や脾臓細胞等を挙げることができる。それぞれの 遺伝子の単離には、公知のプライマーを用いた RT-PCR 法を利用することができます。得られた各領域の遺伝子とリンカー配列とを連結することにより scFv 抗体遺 20 伝子が構成される。

scFv 抗体ファージミドライブラリーからの scFv 抗体ライブラリーの調製方法 25 は次のように行うことができる。まず、scFv 抗体ファージミドライブラリーを構 成する各クローンを宿主にトランスフェクションさせる。次に、この宿主にヘル パーファージを重感染させる。例えば、ファージミドベクター pTZ19R は、ヘルパ ーファージ M13K07 の重感染によってファージ粒子として回収することができる。

このとき利用されるファージミドの cp3 タンパク質が外来タンパク質すなわち scFv 抗体と融合されていれば、完成するファージの表面には scFv 抗体が提示されることとなる。

scFv 抗体ライブラリーの作製方法は上述のものに限られるわけではなく、例え
5 ば、後述の実施例のように、まず、VH 遺伝子、CH 遺伝子、VL 遺伝子、及び CL 遺
伝子とから構成される Fab 型抗体遺伝子を保有するクローンにより構成されるラ
イブラリー（以下「Fab 抗体遺伝子ライブラリー」という）を作成し、各クローン
における Fab 抗体遺伝子を scFv 抗体遺伝子に変換することにより scFv 抗体を保
有するクローンの集合（scFv 抗体遺伝子ライブラリー）を得て、これから上述の
10 方法により scFv 抗体ライブラリーを作製することができる。

本発明の工程 2) では、scFv 抗体ライブラリーを特定の抗原でスクリーニング
し、当該抗原に結合可能な scFv 抗体を発現しているファージクローンが選択され
る。

抗原は、目的に応じて種々のものが用いられる。また、抗原を用いたスクリー
15 ニングは以下に示すパニング法により行うことができる。まず、目的とする抗原
に scFv 抗体ライブラリーを接触させ、この抗原に結合するクローンを回収する。
回収したクローンを増幅し、再び目的の抗原と接触させて、結合するクローンを
回収する工程を繰り返す。ファージの増幅は、ファージを大腸菌に感染させ、回
收することによって行われる。この工程を繰り返すことによって、目的とする反
20 応性を持つ scFv 抗体をその表面に発現しているファージクローンが濃縮される。
抗原との結合性に基づくスクリーニングは、一般にクローンの回収率が上昇する
まで行われる。ここで回収率とは、抗原に対して添加したファージクローンの数
に対する、抗原への結合性を有するものとして回収されたファージクローンの数
の割合である。回収率がその前のスクリーニングに比較して明らかに上昇すると
25 き、目的とする反応性を持つ scFv 抗体をその表面に発現しているファージクロー

ンが濃縮されつつあることを意味する。

工程 3)においては、工程 2)により選択したファージクローンより、scFv 抗体をコードする遺伝子（scFv 抗体遺伝子）が取得される。即ち、ファージクローンより、VH 領域、VL 領域、及びリンカーをコードする遺伝子が切り出される。scFv
5 抗体として CL 領域を含有するものを用いる場合には、VH 領域、VL 領域、及びリンカーに加えて、CL 領域をコードする遺伝子が切り出される。このとき、His, Myc などの Tag を含有するものを用いてもよい。

具体的な scFv 抗体遺伝子の切り出し方法としては、ファージ DNA の scFv 抗体遺伝子導入部位、即ち、scFv 抗体遺伝子の両端の制限酵素サイトを特異的に切断
10 する制限酵素を用いる。このような切り出しを行うため、scFv 抗体ライブラリーを構成する各ファージクローンにおける scFv 遺伝子導入部位を当該制限酵素に
15 対応したユニークな制限酵素サイトにより形成しておく。

工程 3)の後に、工程 3)で取得した scFv 抗体遺伝子の一端又は両端の配列を、
該遺伝子のコードするアミノ酸配列が変化しない条件下で異なる塩基配列に変換
20 する工程（工程 3-1））を行うことができる。この工程により、scFv 抗体遺伝子のコードするアミノ酸配列を変化させることなく、その一端又は両端に所望の制限酵素サイトを形成することができる。これにより、工程 3) で切り出された scFv 抗体遺伝子の一端又は両端の塩基配列を、次の工程 4) において用いられる
25 発現ベクターの導入部位を形成する制限酵素サイトに対応させることができる。
このような工程を行うことにより、発現ベクターの設計の自由度が高くなる。もちろん、予め scFv 抗体遺伝子の両端の制限酵素サイトと発現ベクターの導入部位
とが対応するように、scFv 抗体遺伝子及び発現ベクターを設計することができ、
この場合には工程 3-1) は不要である。工程 3-1) は、適当な合成プライマーを用いた PCR により行うことができる。この場合、工程 3) と同時に工程 3-
1) を行うことができる。即ち、scFv 抗体遺伝子を切り出す際に、scFv 抗体遺伝

子の一端又は両端の配列を変換する2つのプライマーを用いてPCRを行い、制限酵素サイトの変換されたscFv抗体遺伝子を切り出し、かつ増幅する。

また、scFv抗体遺伝子の末端に適当なリンカーを付加することにより、所望の制限酵素サイトを形成してもよい。

5 工程4)では、工程3)、又は工程3)及び工程3-1)で取得したscFv抗体遺伝子を発現ベクターに組み込むことが行われる。

発現ベクターはscFv抗体遺伝子を組み込むことによりscFv抗体遺伝子発現産物と蛍光タンパク質との融合タンパク質を発現可能なものを用いる。このような発現ベクターとしては、5'側より順に、開始コドン、scFv抗体遺伝子を導入する部位、及び蛍光タンパク質をコードする塩基配列を有するものが用いられる。

また、scFv抗体遺伝子を導入する部位と蛍光タンパク質をコードする塩基配列の間にHis-tag、myc-tag、又はHA-tagなどをコードする塩基配列（以下、「タグ配列」という）を有する発現ベクターを用いることができる。かかるベクターを用いることにより、scFv領域と蛍光タンパク質との間に、タグ配列によりコードされる分子が介在される。これにより、タグ分子の特定物質との親和性を利用してscFv抗体を精製することが可能となる。また、タグ配列を入れる位置はこれに限られるものではなく、scFv抗体遺伝子導入部位の5'上流域、又は蛍光タンパク質をコードする配列の下流域に入れておくこともできる。但し、タグ配列にコードされる分子とscFv抗体とが融合したものとして発現される位置に入れる必要がある。

上記特性を備える発現ベクターは、市販の発現ベクターを周知の遺伝子操作技術を用いて改良することにより作製することができる。なお、形質転換させる宿主に応じて、細菌発現用ベクター、動物細胞発現用ベクターを用いる。大腸菌を宿主とした場合の本発明における発現ベクターとして、例えば、pG×His-GFP(クローンテック製)ベクターの開始コドンとHis-Tag配列の間にAscIサイトを付加し

たものを用いることができる。

この発現ベクターにおいては、AscI サイトに scFv 抗体遺伝子が導入される。

このベクターを用いた場合に、後述の工程 5) で得られる発現産物では、標識ペ

プチドであるヒスチジンタグが融合した scFv 抗体が発現される。ヒスチジンタグ

5 は金属イオンとの結合活性を持つタグであって、例えばニッケルカラムに捕捉す

ることができるため、scFv 抗体の精製に利用できる。

同様の目的で、ヒスチジンタグの代わりに、myc-tag、あるいは HA-tag 等を用

いることもできる。その場合には、ヒスチジンタグの場合と同様に、これらのタ

グをコードする塩基配列を組込んだ発現ベクターを用いる。また、scFv 抗体遺伝

10 子に予め His-tag 等をコードする塩基配列を融合しておき、これを発現ベクター

に導入することもできる。この場合には、発現ベクターとして His-tag 等をコー

ドする塩基配列を有するものを使用する必要はない。

蛍光タンパク質の種類は特に限定されず、公知のものを任意に選択して用いる

ことができる。例えば、GFP、RFP、BFP、YFP、CFP を用いること

15 ができ、また、これらの変異体を用いることもできる。変異体としては、例えば、

EGFP (enhanced green fluorescent protein)、EBFP (enhanced blue fluorescent

protein)、EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) が知られている。これら

のタンパク質は特定の波長の光を照射することにより照射光と異なる波長の光を

発光することができ、目的、条件等に応じて任意に選択して用いることができる。

20 また、これらの蛍光タンパク質は単独で用いられることはもちろんのこと、複数

種を任意に選択し、組み合わせて用いることもできる。

上記工程 1) ~ 4) により取得される、scFv 抗体遺伝子、及び蛍光タンパク質

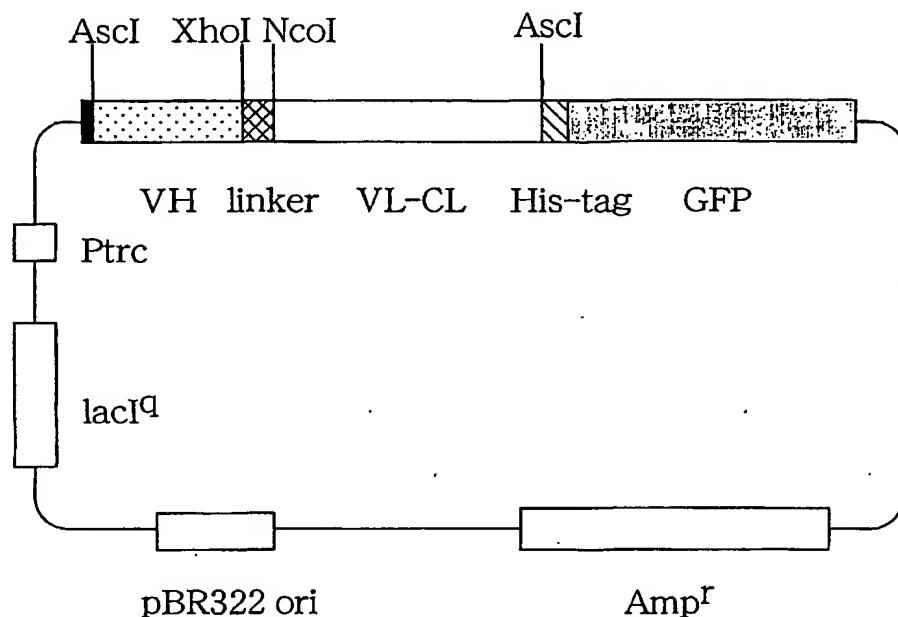
をコードする塩基配列を有する組換えベクターは本発明に含まれる。また、工程

3) の後に上記工程 3 - 1) をさらに行うことにより取得される組換えベクター

25 も本発明に含まれる。この場合においても、上述のように scFv 抗体遺伝子として

CL 遺伝子を含む場合も含まれるものとする。

具体的な組換えベクターとして、次の構成のものを挙げることができる。



本発明における工程 5) では、工程 4) で得られた scFv 抗体遺伝子を有する組
5 换えベクターを用いて宿主を形質転換し、蛍光タンパク質を融合した scFv 抗体が
発現される。

上記の工程により作製される蛍光タンパク質を融合した scFv 抗体は、免疫染色等の免疫学的測定方法に利用できる。本発明の scFv 抗体では、蛍光タンパク質が融合しているため、それ自体で蛍光を発することができる。すなわち、従来の抗体を用いた ELISA 法等においては、標識化された 2 次抗体を必要とするが、本発明の scFv 抗体においてはそれ自体標識化されているため、2 次抗体等を必要とせず、測定工程の簡略化が図れる。また、蛍光を発するために特別の基質を必要としないため、例えば、細胞内で発現させ、これを取り出すことなく直接測定することができる。したがって、特定の抗原の細胞内ないし生体内における発現、分
10 布を直接測定することができる。
15

scFv 抗体をその表面に発現しているファージクローンにより構成される scFv 抗体ライブラリーと、scFv 抗体遺伝子を組込むことにより当該遺伝子の発現産物と蛍光タンパク質との融合タンパク質を発現可能なベクターとを含ませることにより、scFv 抗体作製用キットを構成することができる。scFv 抗体ライブラリー、
5 蛍光タンパク質、発現ベクターとしては、それぞれ上述のものを任意に選択して用いることができる。また、scFv 抗体としては、VH 領域、VL 領域、リンカー、及び CL 領域から構成されるものも含まれる。

また、scFv 抗体遺伝子を有するファージクローン又はファージミドクローンから構成される scFv 抗体遺伝子ライブラリーと、scFv 抗体遺伝子を組み込むことにより該遺伝子の発現産物と蛍光タンパク質との融合タンパク質を発現可能なベクターとを含めることにより、蛍光タンパク質を融合した scFv 抗体作製用キットを構成することができる。この場合において、scFv 抗体遺伝子は VH 遺伝子、VL 遺伝子、リンカー配列、及び CL 遺伝子から構成されるものも含まれる。scFv 抗体遺伝子ライブラリーは、公知のファージ又はファージミドを用い、公知の遺伝子操作技術により scFv 抗体遺伝子を導入することにより作製される。また、蛍光タンパク質、発現ベクターとしては、それぞれ上述のものを任意に選択して用いることができる。

[実施例]

本実施例では、scFv 抗体ライブラリーを調製するために、まず、VH 領域、CH
20 領域、VL 領域、及び CL 領域とから構成される Fab 型抗体遺伝子を含有するクローンの集合からなる Fab 抗体遺伝子ライブラリーを作製した。そして、Fab 抗体遺伝子ライブラリーを scFv 型抗体遺伝子を含有するクローンの集合からなる scFv 抗体遺伝子ライブラリーに変換し、これより scFv 抗体ライブラリーを調製した。なお、本実施例では、scFv 型抗体として、VH 領域、リンカー、及び VL
25 領域 (scFv) に CL 領域が付加した抗体（以下、「scFv-CL 抗体」という）を用い

た。CL 領域を付加した理由は、細胞質内で発現させた場合に安定性の促進が期待されるからである。なお、scFv 抗体ライブラリーの調製方法はこれに限定されるものではない。

1. Fab 抗体遺伝子ライブラリー作製用ファージミドベクターの作製

5 1.1 Fab 抗体遺伝子ライブラリーを作製するためのベクターの作製

図 1 に概念的に示すように、pTZ19R ファージミドベクター（ファルマシア）に M13 ファージの pelB(シグナル配列)、His6 タグ配列、M13 ファージの cp3 タンパク質(Δ cp3(198aa-406aa)N 端欠失キャップシドタンパク質 3)配列、proteinA タンパク質配列を適当な制限酵素部位で組み込みベクター pFCAH9-E8d を作製した(Iba Y. et al., Gene 194: 35-46, 1997. 参照)。軽鎖 λ 5, λ 6 遺伝子に存在する BstPI でその遺伝子が切断されることを避けるために pFCAH9-E8d は XhoI 部位が設けられている。pFCAH9-E8d のインサートの塩基配列を図 2 に、制限酵素サイトと塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を図 3 ~ 5 に示した。

このベクターの所定の位置に重鎖と軽鎖の遺伝子を挿入することにより、実際 15 の抗体タンパク質発現ベクターが完成することとなる。完成したベクターによって発現される抗体の形状は Fab 型であり、重鎖軽鎖は N 末の可変領域に統いて定常領域 CH1, CL をそれぞれ有している。定常領域同士の・SS・結合によって、重鎖と軽鎖は結合されることになる。軽鎖定常領域 CL 遺伝子は前述の cp3 遺伝子と結合されており、結果として発現タンパク質は Fab-cp3 の形状となる。

20 具体的には、以下のようないくつかの操作を行った。

用いたプライマー：

527 Reverse (配列番号： 2) :

5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

599 E8VHf-PstR: (配列番号： 3)

25 3'-CGGCTCCAAGTCGACGGTGTCA-5'

544 E8VHf-PstF: (配列番号: 4)

5'-CAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCA
AGTTGTCCTGCACAGCTCTGGCTTCAACATTAA-3'

545 E8VHf-XbaR: (配列番号: 5)

5 3'-AGACCGAAGTTGTAATTCTGTGGATATACGTGACCCACTCGTCTCCGG
ACTTTCCCAGATCTCACCTAACCTTCCTAA-5'

546 E8VHf-XbaF: (配列番号: 6)

5'-AAGGGTCTAGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAGTGGTAATACTAA
ATATGACCCGAAGGACAAGGCCACTATAACAGCA-3'

10 547 E8VHf-EcoR (配列番号: 7)

3'-TTCCTGTTCCGGTGATATTGTCGTCTGTGTAGGAGGTTGTGTCGGATGGA
TGTCGACTTAAGGGAC-5'

548 E8VHf-EcoF (配列番号: 8)

5'-CAGCTGAATTCCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTGG

15 T-3'

549 E8VHf-BstR (配列番号: 9) :

3'-CAGATAATGACACGACCAATACTAATGCCGTTGAAACTGATGACCCCGGT
TCCGTGGTGCCAGTGGCACAAGG-5'

590 His6-SmaR (配列番号: 10) :

20 3'-GGTTCTCTAACAGTAGTGGTAGTGGTAATTATTCTCGATAGGGCCCT
CGAA-5'

542 E8VLf-SacF (配列番号: 11) :

5'-GACATCGAGCTCACCCAGTCTCCAGCCTCCCTTCTGCGTCTGTGGGAGA
AACTGTCACCACATCACATGT-3'

25 539 E8VLf-KpnR (配列番号: 12) :

- 3'-TGACAGTGGTAGTGTACAGCTCGTTACCCTTATAAGTGTTAATAATCGT
ACCATGGTCGTC-5'
- 542 E8VLf·KpnF (配列番号 : 1 3) :
- 5'·GCATGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTAT-3'
- 5 543 E8VLf·BamR (配列番号 : 1 4) :
- 3'·GGAGTCGAGGACCAAGATATTACGTTTTGGAATCGTCTACCACACGGTAG
TTCCAAGTCACCGTCACCTAGGCCTTGTGTT-5'
- 562 E8VLf·XhoR (配列番号 : 1 5) :
- 3'·TCATGAGGCACCTGCAAGCCACCTCCGTGGTCGAGCTCTAGTTT-5'
- 10 563 E8VLf·XhoF (配列番号 : 1 6) :
- 5'·AGTACTCCGTGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTCGAGATCAA-3'
- 613 NheR (配列番号 : 1 7) :
- 3'·ATCGACAGCT-5'
- 600 E8VLKpnXhoR (配列番号 : 1 8) :
- 15 3'-AAGCCACCTCCATGGTCGAGCTCTAGTTT-5'
- LCP3ASC (配列番号 : 1 9) :
- 3'-TCGAAGTTGTCCTTACTCACAGCCGCCGGTCAGCTGAGGTAA-5'
- hCH1Bst (配列番号 : 2 0) :
- 5'·ACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATGGTCTTCCC
- 20 CCTGG-3'
- hCH1midAS (配列番号 : 2 1) :
- 3'-GGGAGTCGTCGCAGCACTGGCACGGGAGGTCGTCGAA-5'
- hCH1midS (配列番号 : 2 2) :
- 5'·GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCGTGACCGTCCCC-3'
- 25 hCH1H6 (配列番号 : 2 3) :

3'-GGGTCGTTGTGGTCCACCTGTTCAACTCGGGTTAGAACAGTAGT

GGTAGTAGTGGTA-5'

hCH1H6Sma (配列番号 : 24) :

3'-GGGTTAGAACAGTAGTGGTAGTAGTGGTAATTATTCTCGATAGGGCCCT

5 CGAACG-5'

702 BstXhoF (配列番号 : 25) :

5'-GGCACCAACGGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACC-3'

pFCAH3-E8T H鎖部分の作製

1) pAALFab を鋳型にして 527-599 を用いた PCR, 547-590 を用いた PCR を行
10 い DNA 断片を作製した。

2) 544-545, 546-547, 548-549 にて PCR を行い DNA 断片を作製した

3) 1) 2) を混合し 527, 590 による PCR を行い、これを pAALFab の
HindIII-SmaI site にクローニングした

pFCAH3-E8T L鎖部分

15 4) 542-562, 561-613 を用いた PCR を行い DNA 断片を作製した

5) 538-539, 542-543 にて PCR を行い DNA 断片を作製した

6) 4) 5) を混合し 538, 562 による PCR を行い、これを pAALFab の SacI-NheI
site にクローニングした

pFCAH9-E8d

20 6) VH stuffer 部分の作製

pFCAH3-E8T を XbaI, EcoRI にて消化、klenow fragment を作用させて平滑末端
に変えた後 self ligation させて VH 部分の stuffer を作製した。

7) VH stuffer 部分の作製

pFCAH3-E8T を鋳型にして 527-600 にて PCR。6) の HindIII-XhoI site にク

25 ローニングした。

- 8)これをKpnIにて消化、self ligationさせてVL部分のstufferを作製
- 9)SfiI,NcoI,SpeI siteの導入
- pFCAH3-E8Tを鋳型にして527-663にてPCR。1)のHindIII-SacI siteにクローニングした。
- 5 10)Ascl siteの導入
- pFCAH3-E8Tを鋳型にして527-LCP3ASCにてPCRし、それをSacI完全消化、SalI部分消化した2)にクローニングした。
- 11)gammaCH1部分をヒト遺伝子に変換
- ヒトgammaCH1部分にはBstPI siteが存在するためこれをなくす設計でクローニングを行った。扁桃cDNAを鋳型にしてhCH1Bst-hCH1midS, hCH1midAS-hCH1H6にてPCRしたのち、これを混合してhCH1Bst-hCH16SmaにてPCRし、そのDNA断片を3)のBstPI-Sma siteにクローニングした
- 12)Xho siteの導入
- 11)を鋳型に702-663にてPCRを行い、これを11)のBstPI-SacI siteにクローニングした。
- 1-2 重鎖可変領域(VH)を一時的にクローニングするためのベクターの作製
- 公知の手法(Iba Y. et al., Gene 194:35-46, 1997.参照)に従って、まずpAALFabベクター(図1の1))を作製した。pAALFabベクターのXbaIからEcoRIの間を欠落させ、新たに制限酵素切断部位Kpn I, Sfi I, Nco I, Spe Iを付加して、
- 20 pFCAH3-E8Tを経て、VH(重鎖可変領域)をクローニング可能としたベクターpscFvCA-E8VHd(図1の3))を作製し、重鎖可変領域を一時的にクローニングするためのベクターとした。pscFvCA-E8VHdのインサートの塩基配列を図6に、制限酵素サイトと塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を図7~8に示した。
- 25 具体的には

610 scBstSpeSacF (配列番号 : 26) :

5'-CACCAACGGTCACCGTCTCCTCAGGCGGTGGCGGATCAGGTGGCGGTGGA
AGTGGCGGTGGTGGGTCTACTAGTGACATCGAGCTCACCCAG-3'

611 scBstSpeSacR (配列番号 : 27) :

5 3'-GTGGTGCCAGTGGCAGAGGAGTCCGCCACCGCCTAGTCCACCGCCACCT
TCACCGCCACCACCCAGATGATCACTGTAGCTCGAGTGGGTC-5'

527 Reverse (配列番号 : 28) :

5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

619 E8VHf-SfiNcoPstR (配列番号 : 29) :

10 3'-GACGCCGGGTGGCCGGTACCGGCTCCAAGTCGACGTGTC-5'

primer610 と primer611 をアニールさせ、それを pFCAH3-E8T の BstPI-SacI site にクローニングして single chain の作製を行なった。さらに、primer527 と primer619 にて PCR をを行い、これをさらに HindIII-PstI site にクローニングし、SfiI,NcoI site の導入を行った。

15 2. イムノグロブリン軽鎖ライブラリーの作製

2・1 PCR を用いたイムノグロブリン軽鎖遺伝子の単離

骨髄細胞（検体 No.59） 4×10^7 cells、および臍帯血と末梢血のリンパ球から、市販のキット（Pharmacia Biotech 社製 QuickPrep Micro mRNA Purification Kit）を用いて、 $2.6 \mu\text{g}$ の mRNA を得た。この mRNA から cDNA を作製した。

20 cDNA は、GibcoBRL 社製 SuperScript Preamplification System によって作製した。プライマーには、オリゴ dT を用いた。得られた cDNA を鋳型にして、軽鎖遺伝子の取得用 5' プライマー ($\kappa_1 \sim \kappa_6$, $\lambda_1 \sim \lambda_6$) と 3' プライマー (hCKASC プライマーまたは hCLASC プライマー) を用いて、PCR を行った。

PCR 産物は、フェノール処理後、エタノール沈殿して $10 \mu\text{L}$ の TE バッファーに

25 懸濁した。用いたプライマーの塩基配列と PCR の条件は以下のとおりである。

軽鎖遺伝子取得用プライマーの塩基配列中、下線部は SfiI サイト、AscI サイトを示す。

5' -プライマー κ 1～ κ 6

hVK1a (配列番号 : 3 0) :

5 GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC
GACATCCAGATGACCCAGTCTCC

hVK2a (配列番号 : 3 1) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC
GATGTTGTGATGACTCAGTCTCC

10 hVK3a (配列番号 : 3 2) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC
GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCC

hVK4a (配列番号 : 3 3) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC
15 GACATCGTGATGACCCAGTCTCC

hVK5a (配列番号 : 3 4) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC
GAAACGACACTCACGCAGTCTCC

hVK6a (配列番号 : 3 5) :

20 GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC
GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCC

5' -プライマー λ 1～ λ 6

hVL1 (配列番号 : 3 6) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC
25 CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCC

hVL2 (配列番号 : 3 7) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC
CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGC

hVK3a (配列番号 : 3 8) :

5 GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC
TCCTATGTGCTGACTCAGCCACC

hVL3b (配列番号 : 3 9) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC
TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCC

10 hVL4 (配列番号 : 4 0) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC
CACGTTATACTGACTCAACCGCC

hVL5 (配列番号 : 4 1) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC

15 CAGGCTGTGCTCACTCAGCCGCC

hVL6 (配列番号 : 4 2) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC
AATTATGACTCAGCCCCA

3' - プライマー hCKASC (配列番号 : 4 3) :

20 TCGACTGGCGCGCCGAACACTCTCCCTGTTGAAGCTTTGTG

3' - プライマー HCLASC (配列番号 : 4 4) :

TCGACTGGCGCGCCGAACATTCTGTAGGGGCCACTGTCTTCTC

PCR の条件

cDNA	2 μ L
------	-----------

25	10 \times buffer #1 (KOD に添付)	10 μ L
----	---------------------------------	------------

- | | | |
|----|--|-------------|
| | dNTP mix(2.0mM) | 10 μ L |
| | 25mM MgCl ₂ | 4 μ L |
| | 5'側プライマー(100pmol/ μ L) | 1 μ L |
| | 3'側プライマー(100pmol/ μ L) | 1 μ L |
| 5 | 滅菌済 MilliQ | 71 μ L |
| | KOD DNA polymerase(東洋紡 2.5U/ μ L) | 1 μ L |
| | 94°C 1分、55°C 2分、74°C 1分を35サイクル | |
| | 2・2 ライブライマー作製に適した軽鎖を選択して軽鎖遺伝子ライブライマーを作製する方法 | |
| 10 | 2・2・1 軽鎖遺伝子のファージミドへの組込み | |
| | 1で得たPCR産物を以下の条件で制限酵素処理した。 | |
| | PCR 産物 | 10 μ L |
| | 10×NEB4 (AscI に添付) | 5 μ L |
| | 10×BSA (SfiI に添付) | 5 μ L |
| 15 | 滅菌済 MilliQ | 28 μ L |
| | AscI (NEB 社 10 U/ μ L) | 1 μ L |
| | SfiI (NEB 社 20 U/ μ L) | 1 μ L |
| | 37°Cで1時間、50°Cで1時間反応後、そのうち10 μ L分をアガロース電気泳動し、600 bp付近のバンドを切り出して、ジーンクリーン II キット(フナコシ株式会社)で精製した。PCR 産物と同様に制限酵素処理した pFCAH9-E8d(図1の4))をジーンクリーン II キットで精製し、制限酵素処理した PCR 産物と以下の条件で16°Cで4時間～一晩反応させることによりライゲーションした。 | |
| | 制限酵素処理した pFCAH9-E8d | 2 μ L |
| | 制限酵素処理した PCR 産物 | 1 μ L |
| 25 | 10×ligation buffer | 1.5 μ L |

(T4 DNA ligase に添付)

10mM ATP 1.5 μ L

滅菌済 MilliQ 8 μ L

T4 DNA ligase (宝酒造 10 U/ μ L) 1 μ L

5 2-2-2 ファージミドの大腸菌への導入

得られた ligated DNA を用いて以下のように大腸菌 DH12S を形質転換した。

即ち、ligated DNA を一旦エタノール沈殿し、1/5TE(TE を滅菌済 MilliQ で 5 倍希釈したもの)3 μ L に溶解した。そのうち、1.5 μ L をコンピテントセル DH12S(GIBCO BRL 製)20 μ L に懸濁し、以下の条件でエレクトロポレーション

10 行った。

エレクトロポレーター

BRL 社 Cell-Porator(Cat.series 1600)

設定条件；voltage booster 4k Ω

capacitance 330 μ F

15 DC volts Low Ω

charge rate Fast

2-2-3 ファージミドで形質転換した大腸菌からの Fab-cp3 型抗体培地中への分泌

形質転換した上記の大腸菌を形質転換用培地 (SOB) 2mL に植え、37℃で 1 時間振盪培養したあと、一部を寒天培地 (Amp プレート) にまき、残りは、1% 20 グルコース、100 μ g/mL アンピシリン含有 2×TY 培地で培養し、グリセリンストックした。寒天培地は 30℃で incubate し、生えてきたコロニーを楊枝でつづいて分離し、それぞれプラスミドを調製し、軽鎖遺伝子の塩基配列を調べた。

SOB 培地：950mL の精製水に次の成分を加えて振とうし、完全に溶解した後 250mM の KCl 溶液 10mL を加え、5N NaOH で pH7.0 に調製した。精製水を加えて 1000mL に調整した後、オートクレーブで 20 分間滅菌し、使用直前に滅菌

した 2M の MgCl₂ を 5mL 加えた。

bacto·tryptone 20g

bacto·yeast extract 5g

NaCl 0.5g

5 2×YT 培地 : 900mL の精製水に次の成分を加えて振とうし、完全に溶解した後
5N NaOH で pH を 7.0 に調製し、精製水を加えて 1000mL とした。オートクレ
ーブで 20 分間滅菌して使用した。

bacto·tryptone 16g

bacto·yeast extract 10g

10 NaCl 5g

その他の試薬は以下から購入した。

メーカー 品名

シグマ アンピシリソナトリウム

和光純薬 フェノール

15 シグマ BSA

DIFCO 2×YT 培地

和光純薬 カナマイシン硫酸塩

ナカライトスク ポリエチレングリコール 6000

ナカライトスク Tween20

20 片山化学 NaCl

和光純薬 IPTG

和光純薬 スキムミルク

和光純薬 アジ化ナトリウム

和光純薬 トリエチルアミン

25 和光純薬 過酸化水素

和光純薬 O P D 錠

和光純薬 エタノール

κ 1、 κ 2、 κ 3、 κ 4、 κ 5、および κ 6、並びに λ 1、 λ 2、 λ 3a、 λ 3b、 λ 4、
5 λ 5、 λ 6、 λ 7、 λ 8、 λ 9、および λ 10 の全てについて以上の操作を行い、目的
鎖の各グループは、それぞれ実際の生体内でどのような割合で発現しているのか
が既に知られている。PCR 法で増幅してベクターに組み込んだこれらの遺伝子ク
ローンを、in vivo での使用頻度に近い比率になるように混合した。これら軽
鎖の各グループは、それぞれ実際の生体内でどのような割合で発現しているのか
が既に知られている。PCR 法で増幅してベクターに組み込んだこれらの遺伝子ク
ローンを、in vivo での使用頻度に近い比率になるように混合し VL ライブラリー
10 とした。VL ライブラリーにおける各 family の構成比率を以下に示す。

V κ

family	in vivoでの 使用頻度(%)*	VLライブラリー での構成比率(%)	KL200での 構成比率(%)
V κ 1	39	37	30.7
V κ 2	12	12	19.8
V κ 3	36	35	33.7
V κ 4	12	12	10.9
V κ 5	1	2	5.0
V κ 6	**	2***	0.0

* Griffith AD et al. EMBO J. (1994) 13, 3245-60.

**発表時記載なし。

15 *** プライマーVK6-2 で作製した cDNA とプライマーVK6-3 で作製した cDNA
を等量混合。

V λ

family	in vivoでの 使用頻度(%)*	VLライブラリー での構成比率(%)	KL200での 構成比率(%)
V λ 1	43	41	34.1
V λ 2	15	15* ³	15.2
V λ 3	34	32* ⁴	25.3
V λ 4	0	1.5* ⁵	0.0
V λ 5	0	1.0* ⁶	11.1
V λ 6	0	1.0	14.1
V λ 7	6	6	0.0
V λ 8	1	1	0.0
V λ 9	1	1	0.0
V λ 10	-* ²	1	0.0

* Griffith AD et al. EMBO J. (1994) 13, 3245-60.

*2 発表時記載なし。

*3 プライマー VL2 で作製した cDNA5% とプライマー VL2-2 で作製した
5 cDNA10%を混合。

*4 プライマー VL3a-2 で作製した cDNA17% とプライマー VL3b で作製した
cDNA15%を混合。

*5 プライマー VL4a で作製した cDNA0.5% とプライマー VL4b で作製した
cDNA0.5%とプライマー VL4c で作製した cDNA0.5%を混合。

10 *6 プライマー VL5abde で作製した cDNA0.5% とプライマー VL5c で作製した
cDNA0.5%を混合。

次に、VL ライブラリーから無作為に選んだ約 1 0 0 0 個の軽鎖遺伝子の塩基
配列を確認した。すなわち、蛍光プライマー huCH1J (5 '
-ATTAATAAGAGCTATCCCGG-3' / 配列番号 : 45) を用い、サーモシークエ
15 シンスキット (アマシャム・ファルマシア製) とアロカ社製 L1-COR4200L(S)-2 を
使用したジデオキシ法によって塩基配列を決定した。得られた塩基配列を比較し
て重複するクローニングを除いた。更にデータベースと照合し、deletion が無いと確
認されたクローニングについて、予め発現することがわかっている重鎖遺伝子のクロ

ーンの一つ VH3-4 と組み合わせて、発現実験を行った。操作は以下のとおりである。VH3-4 のアミノ酸配列を配列番号：1 に示した。

まず VH3-4 を HindIII と XhoI で消化し、重鎖遺伝子を切り出して、ジーンクリーン II キットで精製した。一方、deletion が無いと確認された軽鎖遺伝子クロ
5 ネンについても HindIII と XhoI で消化し、軽鎖遺伝子を切り出して、ジーンクリーン II キットで精製し、VH3-4 の重鎖遺伝子とライゲーションすることにより、組み合わせた。得られた ligated DNA を用いて大腸菌 DH12S を形質転換した。生えてきたコロニーを試験管にいれた培地にうえ、IPTG で発現を誘導することにより、Fab·cp3 型の抗体分子を培養上清中に発現させた。20 時間程度の
10 培養により、ヘルパーファージの感染無しでも Fab·cp3 型の抗体分子が培養上清に発現される。この培養上清を用いて以下のような ELISA を行った。

2-2-4 ELISA 法による重鎖と軽鎖の正しい発現と会合の検定

1) 抗体結合 96well マイクロタイタープレートの作製

抗 κ 抗体（MBL code No.161）を 0.01M ナトリウムーリン酸緩衝液 pH8.0,
15 0.1% NaN₃ で 1.25 μg/mL で希釈し、100 μL ずつマイクロタイタープレートに添加した。4°C で一晩静置することにより、ウェルに抗 κ 抗体を吸着させた。反応液を捨て、5% BSA in 0.01M ナトリウムーリン酸緩衝液 pH8.0, 0.1% NaN₃ を 200 μL ずつマイクロタイタープレートに添加し、37°C で 2 時間静置することにより、非特異的な吸着を防ぐためのプロッキングを行った。

20 次に、非特異的活性吸収済の抗 λ 抗体（MBL code No.159）を 0.01M ナトリウムーリン酸緩衝液 pH8.0, 0.1% NaN₃ で 2.5 μg/mL に希釈し、100 μL ずつマイクロタイタープレートに添加し氷室で一晩静置した。反応液を捨て、5% BSA in 0.01M ナトリウムーリン酸緩衝液 pH8.0, 0.1% NaN₃ を 200 μL ずつマイクロタイタープレートに添加し 37°C で 2 時間静置し、非特異的な結合を防ぐためのプロ
25 ッキングを行った。

2) 1 次反応

positive control として、ヒト Fab(10 μg/mL)を、negative control として、PBS/0.1%NaN₃をそれぞれ 100 μL ずつマイクロタイタープレートに添加した。IPTG で Fab-cp3 型の抗体分子の発現を誘導した培養上清の原液を 100 μL ずつ
5 マイクロタイタープレートに添加し 37°C で 1 時間反応させた。

3) 2 次反応

1 次反応を終了したマイクロタイタープレートを 0.05%Tween20-PBS で 5 回洗浄した。次いで PBS/0.1%NaN₃ で希釈した抗 Fd 抗体 (1 μg/mL) を 100 μL ずつマイクロタイタープレートに添加し 37°C で 1 時間反応させた。

10 4) 3 次反応

2 次反応を終了したマイクロタイタープレートを 0.05%Tween20-PBS で 5 回洗浄した。次いで PBS/0.1%NaN₃ で希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒツジ IgG 抗体 (4000 倍希釈) を 100 μL ずつマイクロタイタープレートに添加し 37°C で 1 時間反応させた。

15 5) 発色反応および吸光度測定

3 次反応を終了したマイクロタイタープレートを 0.05%Tween20-PBS で 5 回洗浄した。次いで発色基質溶液 (SIGMA 104 phosphatase substrate tablets 1 粒あたり 5mL の 50mM ジエタノールアミン PH 9.8 に溶解したもの) を 100 μL ずつマイクロタイタープレートに添加した。室温で反応させ、405nm の吸光度が
20 0.5 以上になったと思われる時点で、停止液を添加し、プレートリーダー (タイターテック マルチスキャン MCC) で吸光度測定した。

この ELISA で陽性 (吸光度 0.5 以上) となったクローンは、Fab-cp3 型の抗体分子の発現と会合がうまく行われているとし、κ鎖遺伝子、λ鎖遺伝子それぞれ反応性の高いものから 100 個ずつ選択した。両者を混合して Fab-cp3 型の抗体分子の発現と会合がうまく行われているクローンのみを集めたライブラリー
25

KL200とした。

3. 軽鎖遺伝子ライブラリーと重鎖遺伝子ライブラリーの組み合わせライブラリー（Fab 抗体遺伝子ライブラリー）の作製

3-1-1 PCR を用いたイムノグロブリン重鎖遺伝子の単離

5 2-1 と同様の手順を用いて臍帯血、骨髓液、および末梢血のリンパ球、並びに扁桃腺から *human μ primer* (以下に示すプライマーの 6 3 4) あるいは *random hexamer* を用いて cDNA を調製し、この cDNA を鋳型にして、以下に示すヒト抗体重鎖遺伝子の取得用 5' プライマー (VH1～VH7) と 3' プライマー (*human JH* プライマー 4 種を等量混合したもの、以下に示すプライマーの 6 9
10 7～700)、または、*human μ* プライマー (以下に示すプライマーの 6 3 4) を用いて、PCR を行った。表中、下線をつけた部分は *SfiI* サイトを示す。hVH2a は *germ line VH2 family* に対応していないため、新たに VH2a-2 を設計した。また hVH4a では VH4 ファミリー全体に対応していないため、新たに hVH4a-2 を設計した。VH5a も *germ line VH5 subfamily* に対応していなかったため新たに
15 VH5a-2 を設計した。また VH7 に対応する primer として hVH7 を設計した。これらについても遺伝子增幅を行い、pscFvCA-E8VHd に組み込み、どのような遺伝子がとれたのかを塩基配列決定した。hVH5a-2 については hVH1a と配列が酷似しているため、hVH1a で增幅させたものと同様の遺伝子産物が得られることが予想されるためこれについては使用しなかった。PCR 産物は、フェノール処理後、
20 エタノール沈殿して 10 μL の TE バッファーに懸濁した。

634 hum μ CH1R (配列番号： 4 6) :

ATGGAGTCGGGAAGGAAGTC

各 VH family の增幅に使用した primer

Human VH primer *SfiI site* を下線で示す

25 628 hVH1a (配列番号： 4 7) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG

629 hVH2a (配列番号 : 4 8) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC

5 CAGGTCAACTTAAGGGAGTCTGG

630 hVH3a (配列番号 : 4 9) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG

631 hVH4a (配列番号 : 5 0) :

10 GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGG

632 hVH5a (配列番号 : 5 1) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC

CAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTGC

15 633 hVH6a (配列番号 : 5 2) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGG

629-2 hVH2a-2 (配列番号 : 5 3) :

20 GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC

CAGRTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCC

631-2 hVH4a-2 (配列番号 : 5 4) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGG

25 632-2 hVH5a-2 (配列番号 : 5 5) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG

712 hVH7 (配列番号 : 5 6) :

GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC

5 CAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGGTCTGAGT

Human JH primer BstPI, XhoI site を下線で示す

697 hJH1·2 (配列番号 : 5 7) :

GGTGGAGGCACTCGAGACCGGTGACCAGGGTGC

10 698 hJH3 (配列番号 : 5 8) :

GGTGGAGGCACTCGAGACCGGTGACCATTGTCC

699 hJH4·5 (配列番号 : 5 9) :

GGTGGAGGCACTCGAGACCGGTGACCAGGGTTC

700 hJH6 (配列番号 : 6 0) :

15 GGTGGAGGCACTCGAGACCGGTGACC GTGGTCC

cDNA 2 μ L

10 × buffer #1 (KOD に添付) 10 μ L

dNTP mix(2.0mM) 10 μ L

25mM MgCl₂ 4 μ L

20 5'側プライマー(100pmol/ μ L) 1 μ L

3'側プライマー(100pmol/ μ L) 1 μ L

滅菌済 MilliQ 71 μ L

KOD DNA polymerase(東洋紡 2.5U/ μ L) 1 μ L

PCR 条件 : 94°C 1 分、 55°C 2 分、 74°C 1 分を 35 サイクル

25 3·1·2 重鎖遺伝子ライプラリーの作製

3・1・1で得た PCR 産物を以下の条件で制限酵素処理した。

	PCR 産物	10 μ L
	10×K buffer (宝酒造)	5 μ L
	滅菌済 MilliQ	33 μ L
5	HindIII (宝酒造 15 U/μ L)	1 μ L
	XbaI (宝酒造 12 U/μ L)	1 μ L

37℃で 2 時間反応後、そのうち 10 μ L 分をアガロース電気泳動し、400 bp 付近のバンドを切り出して、ジーンクリーン II キット（フナコシ株式会社）で精製した。PCR 産物と同様に制限酵素処理した pscFvCA-E8VHd (図 1 の 3)) をジ
10 ベンクリーン II キットで精製し、制限酵素処理した PCR 産物と以下の条件で 16℃で 4 時間～一晩反応させることによりライゲーションした。

	制限酵素処理した pscFvCA-E8VHd	2 μ L
	制限酵素処理した PCR 産物	1 μ L
	10×ligation buffer	1.5 μ L
15	(T4 DNA ligase に添付)	
	10mM ATP	1.5 μ L
	滅菌済 MilliQ	8 μ L
	T4 DNA ligase (宝酒造 10 U/μ L)	1 μ L

3・1・3 ファージミドの大腸菌への導入

20 得られた DNA を大腸菌 DH12S に形質転換した。具体的には DNA を一旦エタノール沈殿し、1/5TE(TE を滅菌済 MilliQ で 5 倍希釈したもの)3 μ L に溶解する。そのうち、1.5 μ L をコンピテントセル DH12S(GIBCO BRL 製)20 μ L に懸濁し、エレクトロポレーション法により形質転換を行った。

エレクトロポレーター

25 BRL 社 Cell-Porator(Cat.series 1600)

設定条件 ; voltage booster $4\text{k}\Omega$

capacitance $330\ \mu\text{F}$

DC volts Low Ω

charge rate Fast

5 形質転換用培地(SOB)2mLに上記操作の終了した形質転換大腸菌を植え、37℃で1時間振盪培養したあと、一部を寒天培地(Ampプレート)にまき、残りは、1%グルコース、 $100\ \mu\text{g/mL}$ アンピシリン含有2×YT培地で培養し、グリセリンストックした。寒天培地は30℃でインキュベートし、生えてきたコロニーを楊枝でつついで分離し、それぞれプラスミドを調製し、重鎖遺伝子の塩基配列を調べた。
 10 VH1～VH7の全てについてこれらのことを行い、目的のクローンが得られているかどうか確認した。これらの各グループ(ファミリー)のクローンをin vivoでの使用頻度に近い比率になるように混合してVHライブラリーとした。VHライブラリーにおける各ファミリーの構成比率を以下に示す。

family	in vivoでの 使用頻度(%)*	VHライブラリーでの 構成比率(%)
VH1	25	29**
VH2	6.6	7
VH3	40	40
VH4	19	19***
VH5	5	- **
VH6	3.8	4
VH7	1.2	2

15 *Griffith AD et al. EMBO J. (1994) 13, 3245-60.

** 実際にはVH1とVH5は同一のプライマーで増幅されるため、分離して集計できない。

***VH4プライマーで作製したcDNAとVH4-2プライマーで作製したcDNAを

混合してこの割合とした。

3.2 組み合わせ遺伝子ライブラリーの作製

VH ライブラリー 200 μg を下記条件で HindIII と XhoI で消化し、重鎖遺伝子を切り出して、ジーンクリーン II キットで精製した。

5	VH ライブラリー 200 μg	100 μL
	10×K buffer (宝酒造)	40 μL
	滅菌済 MilliQ	205 μL
	HindIII (宝酒造 40 U/ μL)	30 μL
	XhoI (宝酒造 50 U/ μL)	25 μL

10 deletion が無いと確認された軽鎖遺伝子クローン KL200、および VL ライブラリーの挿入されたベクター pFCAH9-E8d についても下記条件で HindIII と XhoI で消化し、軽鎖遺伝子を含む断片を、ジーンクリーン II キットで精製した。

	KL200 または VL ライブラリー	
	を挿入した pFCAH9-E8d	100 μg 100 μL
15	10×K buffer (宝酒造)	40 μL
	滅菌済 Milli-Q	230 μL
	HindIII (宝酒造 40 U/ μL)	15 μL
	XhoI (宝酒造 50 U/ μL)	15 μL

次に、VH 遺伝子ライブラリー断片と軽鎖遺伝子の挿入された pFCAH9-E8d ベクターを、次の条件下、16°Cで一晩反応させてライゲーションした。

	制限酵素処理した	
	VH ライブラリー断片	10 μg 50 μL
	制限酵素処理した KL200 または	
	VL ライブラリーの断片	
25	を含む pFCAH9-E8d	40 μg 50 μL

10×ligation buffer

(T4 DNA ligase に添付) 100 μL

10mM ATP 100 μL

滅菌済 MilliQ 670 μL

5 T4 DNA ligase (宝酒造 10 U/μL) 30 μL

反応の終了したDNAを用いて大腸菌DH12Sを形質転換した。具体的にはDNAを一旦エタノール沈殿し、1/5TE(TEを滅菌済MilliQで5倍希釈したもの)30 μLに溶解した。これをコンピテントセルDH12S(GIBCO BRL製)500 μLに懸濁し、エレクトロポレーションを行った。

10 エレクトロポレーター

BRL社 Cell-Porator(Cat.series 1600)

設定条件；voltage booster 4kΩ

capacitance 330 μF

DC volts Low Ω

15 charge rate Fast

形質転換用培地(SOB)12mLに上記操作の終了した大腸菌を植え、37℃で1時間振盪培養したあと、一部を寒天培地(Ampプレート)にまき、残りは、1%グルコース、100 μg/mLアンピシリン含有2×YT培地500 mLで培養し、グリセリンストックした。寒天培地は30℃でインキュベートし、生えてきたコロニーの数から得られたクローンの数を推定した。それぞれ 4.5×10^{10} クローンが得られた。

扁桃mRNAよりrandom hexamerにて合成したcDNAをもとに得た各VH familyをpscFvCA-E8VHdベクターにクローニングし、KL200と組み合わせたライブラリーをAIMS1とした。(1.28×10¹⁰の独立したクローン)

25 サイ帯血、骨髓液、末梢血、扁桃mRNAよりhuman m primerにて合成した

cDNA をもとに得た各 VH family を pscFvCA-E8VHd ベクターにクローニングし、KL200 と組み合わせた遺伝子ライブラリーを AIMS2 とした。(3.20×10¹⁰ の独立したクローン)

サイ帯血、骨髓液、末梢血、扁桃 mRNA より human μ primer にて合成した
5 cDNA をもとに得た各 VH family を VL library と組み合わせたライブラリーを
AIMS3 とした。(4.50×10¹⁰ の独立したクローン)

更に(AIMS1+AIMS2) : AIMS3 = 1 : 1 で混合し、1×10¹¹ の独立したクローン
からなるライブラリーとした(AIMS4 と呼ぶ)。

4. scFv-CL 抗体遺伝子ライブラリーの調製

10 4.1.1 scNcopFCAH9-E8VHdVLd の作製

pFCAH9-E8d 3 μ g (3 μ L) (図1の4) を参照) を BstPI (3U/ μ L) 3 μ L、
10×H buffer 5 μ L、DW39 μ L と混合し、37°Cで 2 時間、制限酵素処理を行った。
処理後、エタノール沈殿して得られた沈殿を 10 μ L の TE バッファーに溶解した。
これに、SacI (10 U/ μ L) 1 μ L、10×L buffer 5 μ L、DW34 μ L を混合して 37°C
15 で 2 時間、制限酵素処理した後、アガロースゲル電気泳動して、4.7kb 断片を回
収した。回収物をエタノール沈殿して 10 μ L とした (pFCAH9-E8d BstPI-SacI
断片)。

一方、プライマー linF(100pmol/ μ L)5 μ L とプライマー linR(100pmol/ μ L) 5
 μ L を混合し、94°Cで 5 分加熱した後、80°C 5 分、70°C 5 分、室温放置 30 分によ
りアニールさせた。このうち、2 μ L と上記で得られた pFCAH9-E8d BstPI-SacI
断片 1 μ L、10×ligation buffer 1.5 μ L、DW 9.5 μ L、T4DNALigase 1 μ L を混合
し、16°Cで 16 時間反応させた。反応後、エタノール沈殿して 3 μ L に濃縮し、そ
のうち 1.5 μ L を用いて、大腸菌 DH12S コンピテントセル 20 μ L をエレクトロ
ポレーションにより形質転換した。得られたクローンのプラスミドを抽出し、塩
25 基配列を確認して、scNcopFCAH9-E8VHdVLd と名づけた。図 9 に

scNcopFCAH9-E8VHdVLd の構造を模式的に示した。また、図10～図12に scNcopFCAH9-E8VHdVLd のインサート部の塩基配列及びそれにコードされるアミノ酸配列を示した。

5 プライマーlinF (配列番号：61)

GTCACCGTCTCGAGAGGCGGTGGCGGATCAGGTGGCGGTGGAAGTGGCGG
TGGTGGGTCCATGGCCGACATCGAGCT

プライマーlinR (配列番号：62)

10 CGATGTCGGCCATGGACCCACCACCGCCACTTCCACCGCCACCTGATCCGC
CACCGCCTCTCGAGACG

4・1・2 scNcopFCAH9-E8VHdVLdへのAIMS・4 L鎖の組込み

scNcopFCAH9-E8VHdVLd 20 μg (20 μL) を、10×NEB4 buffer 30 μL、10
×BSA 30 μL、NcoI (10 U/μL) 10 μL、AscI (10 U/μL) 10 μL と混合し
15 て 37°Cで2時間、制限酵素処理を行った。アガロースゲル電気泳動により、4.5kb
断片を回収し、エタノール沈殿して 10 μL とした (scNcopFCAH9-E8VHdVLd
NcoI-AscI 断片、5 μg 得られた)。一方、AIMS・4 ライブライアライズミド (AIMS・4
ライブライアライズミドを構成するプラスミド) 20 μg (20 μL) を、10×NEB4 buffer 30
μL、10×BSA 30 μL、NcoI (10 U/μL) 10 μL、AscI (10 U/μL) 10 μL
20 と混合して 37°Cで2時間反応させた。アガロースゲル電気泳動して、680bp 断片
を回収し、エタノール沈殿して 10 μL とした (AIMS・4 ライブライアライズミド
NcoI-AscI 断片、1 μg 得られた)。

scNcopFCAH9-E8VHdVLd NcoI-AscI 断片 2.5 μg (5 μL)、AIMS・4 ライブ
ライアライズミド NcoI-AscI 断片 1 μg (10 μL)、10×ligation buffer 10 μL、
25 DW 72 μL、T4 DNAligase 3 μL を混合し、16°Cで16時間反応させた。エタノ

ール沈殿して $3\mu\text{L}$ に濃縮し、そのうち $1.5\mu\text{L}$ を用いて、大腸菌 DH12S コンピテントセル 0.2mL をエレクトロポレーションにより形質転換した。エレクトロポレーション後の DH12S を SOC 培地に植え、 37°C で 1 時間培養した後、TYGA 培地 2 L で 30°C 一晩培養した。一部を寒天培地にまいてクローンの総数を見積もったところ、 2.1×10^8 であった。一晩培養した大腸菌からプラスミドを抽出したところ、 2mg 得られた。これを AIMS-4 VL ライブラリープラスミドとした。

4·1·3 AIMS-4 VL ライブラリープラスミドへの AIMS-4 H 鎖の組込みと形質転換

4·1·2 で得られた AIMS-4 VL ライブラリープラスミド $500\mu\text{g}$ ($200\mu\text{L}$) を HindIII ($50\text{U}/\mu\text{L}$) $20\mu\text{L}$ 、 $10\times\text{M buffer}$ $40\mu\text{L}$ 、DW $240\mu\text{L}$ と混合し 37°C で 2 時間、制限酵素処理した後、BAP C75 ($0.4\text{U}/\mu\text{L}$) を $10\mu\text{L}$ 添加し、 37°C で 2 時間、 50°C で 15 分反応させた。フェノール処理後、エタノール沈殿して、 $20\mu\text{L}$ TE buffer に溶解した。これに、XhoI ($50\text{U}/\mu\text{L}$) $20\mu\text{L}$ 、 $10\times\text{H buffer}$ $40\mu\text{L}$ 、DW $320\mu\text{L}$ を混合し、 37°C で 2 時間制限酵素処理した。これをアガロースゲル電気泳動して、 4.5kb 断片を回収し、エタノール沈殿して $40\mu\text{L}$ とした (AIMS-4 VL ライブラリープラスミド XhoI-HindIII BAP 断片、 $220\mu\text{g}$ 得られた)。

一方、AIMS-4 ライブラリープラスミド $600\mu\text{g}$ ($600\mu\text{L}$) を、HindIII ($50\text{U}/\mu\text{L}$) $20\mu\text{L}$ 、 $10\times\text{M buffer}$ $80\mu\text{L}$ 、DW $100\mu\text{L}$ と混合し 37°C で 2 時間切斷した。フェノール処理後、エタノール沈殿して、 $50\mu\text{L}$ TE buffer に溶解した。これに、XhoI ($50\text{U}/\mu\text{L}$) $20\mu\text{L}$ 、 $10\times\text{H buffer}$ $40\mu\text{L}$ 、DW $290\mu\text{L}$ を混合し、 37°C で 2 時間制限酵素処理した。その後、BAP C75 ($0.4\text{U}/\mu\text{L}$) を $10\mu\text{L}$ 添加し、 37°C で 2 時間、 50°C で 15 分反応させた。アガロースゲル電気泳動して、 0.5kb 断片を回収し、エタノール沈殿して $40\mu\text{L}$ とした (AIMS-4 ライブラリープラスミド XhoI BAP-HindIII BAP 断片、 $41\mu\text{g}$ 得られた)。

上記方法により調製した AIMS-4 VL ライブラリープラスミド XhoI-HindIII

BAP 断片 $50\mu\text{g}$ ($9.1\mu\text{L}$)、AIMS-4 ライブライアライブルスマド XhoI BAP - HindIII BAP 断片 $41\mu\text{g}$ ($40\mu\text{L}$)、 $10\times$ ligation buffer $30\mu\text{L}$ 、DW $195.9\mu\text{L}$ 、及び T4 DNAligase $25\mu\text{L}$ を混合し、 16°C で 16 時間反応させた。これをアガロースゲル電気泳動して、 4.5kb 断片を回収し、エタノール沈殿して $1/10\text{TE}$ buffer で $36\mu\text{L}$ とした ($35\mu\text{g}$ 得られた)。これに、 $10\times$ kinase buffer $5\mu\text{L}$ 、 10mM ATP $5\mu\text{L}$ 、T4 polynucleotide kinase($10\text{U}/\mu\text{L}$) $4\mu\text{L}$ を添加し、 37°C で 1 時間反応させた。さらに、 $10\times$ ligation buffer $1000\mu\text{L}$ 、DW $8750\mu\text{L}$ 、T4 DNAligase $200\mu\text{L}$ を混合し、 16°C で 16 時間反応させ、セルフライゲーションを行った。1・ブタノールで濃縮後、エタノール沈殿して $1/10\text{TE}$ で $200\mu\text{L}$ とし、これを用いて大腸菌 DH12S コンピテントセル 5mL をエレクトロポレーションにより形質転換した。エレクトロポレーション後の DH12S を 50mL の SOC 培地に植え、 37°C で 30 分培養した後、TYGA 培地 2 L で 30°C 一晩培養した。一部を寒天培地にまいてクローニの総数を見積もったところ、 1.1×10^{11} であった。このようにして得られたクローニの集合からなるライブライアライアライブルスマド AIMS-5 とした。図 1 3 の a) に、AIMS-5 抗体遺伝子ライブライアライブルスマドを構成するクローニの基本的な構造を示す。

4-2 scFv-CL 抗体遺伝子ライブライアライブルスマド(AIMS-5)から scFv-CL 抗体ファージライブライアライブルスマドの作製

100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアンピシリンを加えた $2\times$ YT 培地 300mL を入れた 5 リットルのフラスコ 16 本に AIMS-5 懸濁液を 2.5mL を加え、 37°C で振とう培養し 1 時間おきに波長 600nm における吸光度を測定しながら、吸光度が 1.0 になるまで増殖させた。培養液にヘルパー ファージ液(M13KO7)をフラスコ当たり 12mL 加えてヘルパー ファージを感染させ、 37°C で 2 時間培養し、ヘルパー ファージ感染済み DH12S とした。

5 リットルのフラスコ 24 本に $2\times$ YT 培地 600mL と $100\mu\text{g}/\text{mL}$ のアンピシリン 0.6mL 、 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ のカナマイシン 0.8mL 、ヘルパー ファージ感染済み DH12S

200mLを加えて37℃で20時間振とう培養した。

菌体は4℃で8000rpm、10分間遠心し、上清を集め。上清に20%のポリエチレングリコール／2.5M NaCl 4Lを加えて約20分間静かに攪拌した後、4℃で8000rpm、20分間遠心、沈殿を1LのPBSで溶かし、20%のポリエチレングリコール／2.5M NaCl 200mLを加えて約20分間静かに攪拌した後、4℃で8000rpm、20分間遠心した。上清を捨ててさらに4℃で8000rpm、3分間遠心して沈殿を回収した。沈殿は0.05% NaN₃を加えたPBSで溶解し、4℃で1000rpm、15分間遠心し、上清を回収した後、4℃で8000rpm、3分間さらに遠心して上清を回収した。

10 回収したファージ溶液の力価は以下のようにチェックした。すなわち、ファージ溶液をPBSで10⁶、10⁷、10⁸希釈し、その10μLをDH12S 990μLに感染させ、37℃で1時間培養した。これをLBGAプレートに100μL播いて30℃で18時間培養した。コロニーの数をカウントすることにより希釈前の原液の力価を算出した。ファージ溶液原液を2%スキムミルク及び0.05% NaN₃を含むPBSに2×10¹⁴/mLになるよう懸濁した。

5. scFv-CL 抗体ライブラリーから特定の抗原に特異的に結合するファージの選択

本実施例では、モデル抗原として *C.elegans* の細胞内で発現していると考えられる cDNA である「CC046」の大腸菌での発現産物を用いた。具体的には、CC046 のN末端の96アミノ酸に相当する部分（CC046抗原）を用いた。CC046抗原に特異的に結合するファージの選択（スクリーニング）は、以下に示すパニング法によって行った。

5-1 スクリーニング用試験管の作製

CC046抗原をPBSで20μg/mLに調製し、試験管3本（Nunc社製 Maxisorp）に3mLずつ添加して4℃で18時間インキュベートして、試験管内表面へ抗原を

吸着させた。吸着後、抗原溶液を捨て、2%スキムミルク含有 PBS 溶液 3mL ずつを加えて 25℃で 1 時間反応させ、ファージ抗体が非特異的に試験管に結合することを防ぐためにブロッキングを行った。

5-2 スクリーニング操作

5 作製した抗原吸着済試験管に 4 で得た AIMS-5 ライブラリーを 2%スキムミルク、0.1%Tween20 含有 PBS になるよう溶解して 1×10^{14} CFU/9mL に調製し、この液を試験管 3 本に 3mL ずつ添加して 25℃で 2 時間反応させた後、0.1%Tween20 を加えた PBS で 4 回、PBS で 4 回、および滅菌した超純水 (MilliQ にて作製) で 1 回洗浄した。

10 続いて抗原結合試験管に結合したファージを以下のように回収した。すなわち、0.1M トリエチルアミン (pH12.3) を試験管 1 本当たり 3mL 添加し、ローテーターを用いて室温で 20 分間反応させ亜離させた後、1M Tris-HCl 緩衝液 (pH6.8) 1.1mL を加えて中和し、この液を回収した。

5-3 回収したファージの増幅

15 回収した液は（ファージの大腸菌への感染）（ヘルパーファージの感染）（ファージの回収）の処理を行い、含まれているファージを精製・増幅した。

1) ファージの大腸菌への感染

大腸菌(DH12S)を 2×YT 培地 50 mL で培養し、波長 600nm の吸光度が 0.5 になるよう増殖させ、上記で亜離させたファージ液を加えて 37℃で 1 時間振とう 20 培養した。

2) ヘルパーファージの感染

1)の培養液 62.3mL をとり、2×YT 培地 425mL、40% グルコース 12.5mL、および $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ アンピシリン 0.5mL を加えて 37℃で波長 600nm における吸光度が 0.5 になるまで培養した後、4℃、5000rpm で 10 分間遠心して菌体を沈 25 殆させ、回収して $100\text{mg}/\text{mL}$ アンピシリン 0.3mL を加えた 2×YT 培地 300mL

に懸濁した。これに 3×10^{10} cfu/mL のヘルパーファージ M13K07 を 1/100 量加え、37℃で 1 時間振とう培養した。

培養液を予め 37℃に暖めた培地（2×YT 培地に 100 μg/mL アンピシリンと 70 μg/mL のカナマイシンを加えた液）900mL に加えて 37℃で一晩培養した。

5 3) ファージの回収

2)の培養液を 4℃で 7000rpm、10 分間遠心し、その上清に 2.5M の塩化ナトリウムを加えた 20% のポリエチレングリコールを 1/5 量加えて室温で 20 分間静置した後、4℃で 8000rpm、15 分間遠心して沈殿を回収し、培養液の 1/10 量の滅菌 PBS を加えて溶解し、再度 2.5M の塩化ナトリウムを加えた 20% のポリエチレングリコールを 1/5 量加えて 4℃で 10000rpm、20 分間遠心して上清を捨て、さらにスピンダウンして 4℃で 10000rpm、2 分間遠心した。これに 0.05% の NaN₃ を加えた PBS を培養液の 1/100 量加えて沈殿を溶解し、ファージを回収した。

5-4 増幅したファージによる再スクリーニング

15 増幅したファージを用いて 5-2 と同様に抗原結合試験管を用いてスクリーニングを繰り返した。スクリーニングでの洗浄は、非特異に吸着したファージを乖離し、結合力の高いファージを選択する上で重要なステップであることから、2 回目以降のスクリーニングにおける洗浄条件は以下のようにした。

2 回目；PBS+0.1% Tween20 で 6 回、PBS で 6 回、滅菌した超純水で 1 回
20 3 回目；PBS+0.1% Tween20 で 13 回、PBS で 13 回、滅菌した超純水で 1 回

5-5 スクリーニングによって得られた抗体の抗原結合活性（アフィニティー）の測定

本発明者らは、以上のスクリーニングにより得られたファージを大腸菌に感染させ、その後ヘルパーファージを重感染させることなく長時間培養することにより、大腸菌外に cp3 融合型 scFv-CL 抗体が分泌されることを発見した。

そこで、ファージによってコードされる scFv-CL 抗体の抗原結合活性を、ファージ表面に発現されている抗体ではなく、cp3 融合型 scFv-CL 抗体を用いて行った。具体的な方法は以下のとおりである。

5-5-1 cp3 融合型 scFv-CL 抗体の発現誘導

5 まず、以上のスクリーニングにより得られたファージを大腸菌 DH12S に感染させた。次に、ファージの感染した大腸菌を、YTGA 培地（1% グルコース、100 μg/mL のアンピシリン含有 2×YT 培地）を含む寒天培地にまき、生えてきたコロニーの中から数十個を選択し、1% グルコースと 100 μg/mL のアンピシリンを加えた 2×YT 培地 3mL にそれぞれのクローンを植え終夜培養した。0.1% グルコースと 100 μg/mL のアンピシリンを加えた 2×YT 培地 10mL に終夜培養した培養液を 100 μL を入れ、対数増殖期に達したら、1M の IPTG (イソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトシド) を 10 μL 加えてさらに 30°C で 21 時間培養した後、培養液 1.5mL をエッペンドルフチューブにとり、4°C で 10000r.p.m. 5 分間遠心してその培養上清をとり、0.1% となるようアジ化ナトリウムを添加して検体とした。

15 5-5-2 ELISA 法による抗原結合活性（アフィニティー）の測定

まず、ELISA 用のプレートを以下のように調製した。CC046 抗原 10 μg/mL を 96 ウエルマイクロタイタープレート (Nunc 社製 Maxisorp) の各ウェルに 100 μL 添加して 4°C で 18 時間結合させたのち、5 % BSA 含有リン酸緩衝液（ブロッキング液）を各ウェルに 200 μL 添加して 37°C で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング液を捨てた後、PBS で 1 回洗浄してアフィニティーの測定に用いた。このようにして得られたプレートの各ウェルに、5-5-1 で得られた検体を 100 μL ずつ加え、25°C 1 時間反応させた。反応後、PBS で 4 回洗浄し、500 倍希釈のウサギ抗 cp3 抗体 (MBL 製) を 100 μL 加えて 25°C で 1 時間反応させた。各ウェルを PBS で 4 回洗浄した後、1000 倍希釈した HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (MBL 製) を 100 μL 加えて、25°C で 1 時間反応させた。再度 PBS で 4 回

洗浄し、オルトフェニレンジアミンと過酸化水素の溶液 100 μ L を加えて暫時反応させた後、1.5N リン酸 100 μ L を加えて反応を停止し、波長 492nm における吸光度を測定した。その結果 25 クローン中 21 クローンに活性が確認された。

これら 21 クローンについて DNA 塩基配列を決定したところ、7 種類のクローンであることがわかった。DNA 塩基配列の解析は、DNA シークエンサー (LI-COR 社製) を用いた公知の方法 (ジデオキシ法) により行った。

5-5-3 免疫蛍光染色法による各クローンの抗原結合活性の比較

5-5-2 で得られた 7 種類のクローンについて抗原結合活性を免疫蛍光染色法により比較した。免疫染色の材料には *C.elegans* の初期胚を用いた。

10 まず、周知の方法を用いて *C.elegans* を飼育し、受精卵を得た。受精卵が初期胚にまで成長した後に、スライドグラス上にとり、-20°C に冷却したエタノール中にスライドグラスごと 10 分間浸した。次に、-20°C に冷却したアセトンに 10 分間浸した。室温に放置し、アセトンが揮発したら PBS に 5 分間浸した。次いで、5%スキムミルク含有 PBS に 1 時間浸してブロッキングした。

15 次に、5-5-2 で陽性（活性が認められた）であったサンプル (scFv-CL 抗体溶液) の培養上清を 5% スキムミルク含有 PBS で 2 倍に希釀し、25 μ L を上記で準備した *C.elegans* の結合したスライドグラス上の初期胚に添加し、室温で 2 時間反応させた。

反応後、抗体液をスライドグラスから除き、洗浄液 (0.1M Tris-HCl pH7.5, 0.2M NaCl, 0.1% Tween) 中に室温で 10 分間浸して洗浄を行った。洗浄液を取り替えてもう 2 度同じ操作を繰り返した。

次にウサギ抗 cp3 抗体 (cp3 タンパク質をウサギに免疫することによって作製) を 5% スキムミルク含有 PBS で 200 倍希釀したもの 25 μ L をスライドグラス上の初期胚に添加し、室温で 2 時間反応させた。反応が終了したら抗体液をスライドグラスから除き、洗浄液中に室温で 10 分間浸して洗浄を行った。洗浄液を取

り替えてもう 2 度同じ操作を繰り返した。

続いて、Cy3 標識抗ウサギ IgG 抗体を 5%スキムミルク含有 PBS で 800 倍希釈したもの 25 μL をスライドグラス上に滴下し、4°C で 1 晩反応させた。

反応が終了したら、抗体液をスライドグラスから除き、洗浄液（0.1M Tris-HCl pH7.5, 0.2M NaCl, 0.1% Tween）中に室温で 10 分間浸して洗浄を行った。洗浄液を取り替えてもう 1 度同じ操作を繰り返した。

続いて、50mL の洗浄液に 1mg/mL DAPI を 1μL 添加し、この中にスライドグラスを室温で 10 分間浸した。

液を吸い取った後、封入剤をのせ、カバーガラスをかけて顕微鏡観察した。

10 5-5-4 ウエスタンプロットによる各クローンの抗原結合活性の比較

以下に示す周知の方法により 5-5-2 で得られた各クローンの抗原結合活性を比較した。

CC046 精製抗原を 1 レーンあたり 100ng または 10ng 分を SDS-PAGE で電気泳動した。SDS-PAGE ゲルをメンブレンに転写した。

15 メンブレンをブロッキングした後、5-5-2 で得られた各クローンの培養上清を 4 倍希釈（5%スキムミルク共存下）にしてメンブレンにのせ、反応させた。

室温で 1 時間反応後、0.05%Tween20-PBS で 3 回洗った。洗浄済みのメンブレンに抗 cp3 抗体（500 倍希釈、5%スキムミルク共存下）を添加し、室温で 1 時間反応させた。反応後 0.05%Tween20-PBS で 3 回洗った。

20 洗浄済みメンブレンに HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体（×1000、MBL code No.458）を添加し、室温で 1 時間反応させた。反応後、0.05%Tween20-PBS で 3 回洗った。

25 化学発光試薬（Renaissance;Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus, NEN Life Science Products, Inc.）にメンブレンを浸し、ラップに包んで、フィルムに露光した。フィルムを現像して結果を評価した。

以上の結果及び 5-5-3 の結果より、最も抗原結合活性の高いクローンを選択し（クローン CC046N2 と呼ぶ）、以降の実験に用いた。

6. cp3 融合型 scFv-CL 抗体から GFP 融合型 scFv-CL 抗体への変換

6·1 GFP 融合型 scFv-CL 抗体発現用ベクターの作製

5 図 1 3 の b) 下段に示されるように、p6×His-GFP ベクター（クロンテック製）の開始コドンと His-tag 配列の間に、AscI サイトを付加して発現用ベクター pAschGFP を作製した。

このベクターの AscI サイトに scFv-CL 遺伝子を挿入することにより、実際の抗体タンパク質発現用のベクターが完成する（図 1 3 の c)）。このベクターより
10 発現される抗体は scFv-CL 型であり、GFP は His-tag を介して CL 領域に連結することとなる。

AscI サイトを付加する具体的な操作は以下のように行った。p6×His-GFP ベクター(0.1mg/mL)0.5 μL, 10×LA PCR bufferII 10 μL, dNTPmix 16 μL, 25mM MgCl₂ 10 μL, プライマーGFPAscF (100pmol/μL) 1 μL, プライマーGFPAscR (100pmol/μL) 1 μL, LA Taq polymerase (5U/μL) 1 μL, 減菌水 60.5 μL を氷上で混合し、ミネラルオイルを 2 滴添加して、94℃で 5 分保温した。94℃ 1 分, 55℃ 1 分, 72℃ 4 分を 30 サイクル繰り返し、さらに 72℃, 7 分インキュベートした。

GFPAscFprimer (配列番号 : 6 3)

20 TAGGCGCGCCAGGGGGTTCTCATCAT (27mer)

GFPAscRprimer (配列番号 : 6 4)

AAGGCGCGCCATGGTTATTCCCTCCTT (27mer)

得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で確認後、フェノール処理、エ
25 タノール沈殿して 10 μL に濃縮した。これに、10×NEB4 buffer 10 μL, 減菌水

75 μL, Ascl (10U/L) 5 μL を加え、37°Cで3時間保温した。1/5量をアガロースゲル電気泳動して目的の断片を回収し、エタノール沈殿して濃縮し、30 μL の TE buffer に溶解した。これをライゲーション反応に供さず、周知の方法によりセルフライゲーションを起こさせ、環状のプラスミドベクターとすることもできる。

- 5 上記と同様の方法により、RFP (Red Fluorescent Protein) 融合型 scFv-CL 抗体を発現させるベクター pAschRFP を作製することができる。また、これを用いて以下の操作を行えば、RFP 融合型の scFv-CL 抗体を発現させることができる。

6-2 クローン CC046N2 より scFv-CL 抗体遺伝子の増幅

- 10 クローン CC046N2 を用いて PCR 法を行い、scFv-CL 抗体遺伝子を増幅した。この際、Ascl サイトを含む2つのプライマーを合成し、これらを用いることにより、scFv-CL 抗体遺伝子部分にコードされるアミノ酸配列を変化させない条件下において VH 遺伝子の N 末端の SfiI サイトを Ascl サイトに変換した。図 13 の b) 上段に増幅された scFv-CL 抗体遺伝子を模式的に示した。

- 15 PCR 法に用いたプライマーを以下に示す。なお、小文字部分が Ascl 部位である。

Forward プライマー (Asc3F) (配列番号 : 65)

5'-AAGggcgccAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTG-3'

- 20 Reverse プライマー (AscR) (配列番号 : 66)

5'-GTCGACTggcgcc-3'

PCR 法の具体的な方法を以下に示す。

クローン CC046N2 0.5 μL, 10×buffer #1 10 μL, dNTPmix 10 μL, 25mM

MgCl₂ 4 μL, プライマー Asc3F (100pmol/μL) 1 μL, プライマー AscR

- 25 (100pmol/μL) 1 μL, KOD polymerase (2.5U/μL) 1 μL, 減菌水 72.5 μL を氷上

で混合し、ミネラルオイルを2滴添加して、94℃で1分保温した。94℃ 1分, 55℃ 1分, 72℃ 1分を25サイクル繰り返した。得られたPCR産物をアガロースゲル電気泳動で確認後、フェノール処理、エタノール沈殿して10μLに濃縮した。

- 得られたPCR産物は、アガロースゲル電気泳動で確認後フェノール処理後、
5 エタノール沈殿して10μLのTE bufferに懸濁した。

6-3 発現ベクターへのscFv-CL抗体遺伝子の導入

6-2で得られたPCR産物を以下の条件で制限酵素処理した。

PCR産物 10μL

10×NEB4 buffer (NewEnglandBiolabs製) 10μL

10 滅菌済 MilliQ 75μL

Ascl (NewEnglandBiolabs製) 10U/μL 5μL

37℃で3時間反応後、1/2量をアガロースゲル電気泳動して目的の断片を回収し、エタノール沈殿して濃縮し、30μLのTEに溶解した。

他方、同様に発現用ベクターpAscHGFP(図13のb)下段)を制限酵素処理
15 し、ジーンクリーンIIキットで精製した。

次に上記処理をしたPCR産物と発現用ベクターを、16℃、4時間～一晩、以下の条件下で反応させることによりライゲーションした。

制限酵素処理したpAscHGFP 2μL

20 制限酵素処理したPCR産物 1μL

10×ligation buffer 1.5μL

(T4 DNA ligaseに添付)

10mM ATP 1.5μL

滅菌済 MilliQ 8μL

25 T4 DNA ligase (宝酒造 10 U/μL) 1μL

以上の操作の結果得られたベクター (pscFv(CC046N2)-CL-GFP プラスミド) を GFP 融合型 scFv-CL 抗体作製に用いた。pscFv(CC046N2)-CL-GFP プラスミドの DNA 配列及びアミノ酸配列を図 14 に示した。

5 7. 大腸菌内での GFP 融合型 scFv-CL 抗体の产生

7-1 pscFv(CC046N2)-CL-GFP プラスミドの大腸菌への導入

pscFv(CC046N2)-CL-GFP プラスミドを用いて、エレクトロポレーションにより大腸菌 DH12S を形質転換した。具体的には pscFv(CC046N2)-CL-GFP プラスミドを 1/10 量を TE 3 μL に溶解し、これをコンピテントセル DH12S(GIBCO BRL 製) 20 μL に懸濁し、エレクトロポレーションを行った。

エレクトロポレーター

BRL 社 Cell-Porator(Cat.series 1600)

設定条件 ; voltage booster 4kΩ

capacitance 330 μ F

15 DC volts Low Ω

charge rate Fast

形質転換用培地 (SOB) 2mL に上記操作の終了した大腸菌を植え、37℃で 1 時間振盪培養したあと、TYGA 寒天培地上で培養した。形質転換体 24 クローンについて大腸菌からプラスミド DNA を周知の方法を用いて調製し、制限酵素 PvuII によって切断し、アガロースゲル電気泳動に供した。その結果(正しい向きの場合は 0.3, 1.7, 4.8kb の長さの断片が得られる)により、挿入された scFv-CL 遺伝子の向きが正しいクローンを選択した。

8. GFP 融合型 scFv-CL 抗体の精製及び解析

25 8-1 GFP 融合型 scFv-CL 抗体の発現誘導及び精製

まず、7-1 によって得られた pscFv(CC046N2)-CL-GFP プラスミドをもつ大腸菌を 1 リットルの 100 μg/mL アンピシリン含有 2×YT 培地に懸濁し、30℃で培養した。大腸菌の濃度を波長 600nm の吸光度により測定し、log phase になったところで、1mM になるように IPTG を添加し、30℃でさらに 21 時間培養した。

- 5 次に、培養液を遠心分離して菌体を回収し、菌体に 30mL の 50mM Na-リン酸緩衝液/300mM NaCl pH8 を加え、超音波処理により菌体を破碎した。破碎液を遠心分離し、その上清 30mL を平衡化した Ni-NTA アガロースカラム(ゲル容量 2.8 mL)にアブライした。50mM リン酸ナトリウム／300mM NaCl pH8、250mL でカラムを洗浄した後、10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150, 200, 10 250mM イミダゾール 1mL で溶出した。各溶出フラクションに波長 366nm の光を照射し、蛍光を発するフラクション(30-90mM)を選択した。選択したフラクションのタンパク濃度を測定した結果、約 200 μg のタンパク質が得られていた。この精製タンパク質溶液を用いて以下の解析を行った。

8-2 SDS-PAGE による精製タンパク質の解析

- 15 8-1 で得られた精製タンパク質溶液を SDS-PAGE で解析した。なお、比較例として、精製前の菌体破碎液（粗抽出液）を用いた。

SDS-PAGE の結果を図 15 に示した。図 15において、レーン 2 が精製タンパク質溶液を流したレーンである。また、レーン M 及びレーン 1 には、分子量マーク及び比較例である精製前の菌体破碎液を泳動した。

- 20 図 15 に示されるように、粗抽出物では夾雜しているタンパク質のため判別できないが、精製タンパク質溶液では濃縮され、予測される位置（矢印で示される位置）にバンドが明らかに検出できた。

8-3 精製タンパク質の ELISA 法による抗原結合活性（アフィニティー）の測定

- 8-1 で得られた精製タンパク質（GFP 融合型 scFv-CL 抗体）の抗原（CC046）に対する結合活性を ELISA 法により測定した。具体的な方法及び条件を以下に示す。

まず、ELISA 用のプレートを以下のように調製した。抗原 20 μg/mL を 96 ウエルマイクロタイタープレート (Nunc 社製 Maxisorp) の各ウェルに 100 μL 添加して 4°C で 1.8 時間結合させたのち、5 % BSA (ブロッキング液) を各ウェルに 200 μL 添加して 37°C で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング液を捨てた後、

- 5 PBS で 1 回洗浄してアフィニティーの測定に用いた。

このようにして得られたプレートの各ウェルに、8-1 で得られた精製タンパク質溶液を倍数希釈したものを 100 μL ずつ加え、37°C 1 時間反応させた。反応後、PBS で 4 回洗浄し、5000 倍希釈のウサギ抗 GFP 抗体 (MBL 社製) 100 μL 加えて 37°C で 1 時間反応させた。各ウェルを PBS で 4 回洗浄した後、10000 倍希釈した
10 HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (MBL 製) を 100 μL 加えて、37°C で 1 時間反応させた。各ウェルを PBS で 4 回洗浄した後、発色基質溶液(OPD)を 100 μL 加え、前に述べたようにプレートリーダーで 492nm の吸光度を測定した。

その結果、5-5-3 における cp3 融合型 scFv-CL 抗体と同等の抗原活性が認められた。

- 15 8-4 精製タンパク質溶液を用いた免疫蛍光染色

次に、8-1 で得た精製タンパク質溶液に、抗原 CC046 に特異的に結合し、かつ蛍光を発する抗体分子が存在することを証明するために、様々なステージにおける *C.elegans* の胚細胞について免疫蛍光染色を行った。

- まず、8-1 で得た精製タンパク質溶液(scFv-CL-GFP)を 5% スキムミルク含有
20 PBS で 1 μg/mL に希釈し、25 μL を前に述べた要領で準備した *C. elegans* の結合したスライドグラス上に添加し、4°C で 1 晩反応させた。

次に抗体液をスライドグラスから除き、洗浄液(0.1M Tris-HCl pH7.5, 0.2M NaCl, 0.1% Tween) 中に室温で 10 分間浸し、洗浄液を取り替えてもう 1 度同じ操作を繰り返した。

- 25 50mL の洗浄液に 1mg/mL DAPI を 1 μL 添加し、この中にスライドグラスを室

温で 10 分間浸した。

液を吸い取ったのち、封入剤をのせ、カバーガラスをかけて顕微鏡観察した。

このようにして調製したサンプルの染色像の観察には、フィルターセット No.10（励起フィルター BP450-490、ダイクロイックミラー FT510、バリアフィルター BP515-565）（Zeiss 社製）を用いた。尚、DAPI による DNA 染色を同時に行つた。

初期胚を観察した結果を図 16 の a に示す。矢印 A 示した部分（中心体部分）に GFP による蛍光が観察される。即ち、はっきりと抗原 CC046 を認識する分子の存在が確認される。よって、精製タンパク質溶液中に、CC046 を特異的に認識し、かつ蛍光を発する GFP 融合型 scFv-CL 抗体の存在が確認された。また、CC046 は中心体に局在することがわかる。尚、矢印 d で示した部分には DAPI による蛍光が観察される。

また、図 16 の b は、5-5 で得られたクローンより取得した cp3 融合型 scFv-CL 抗体を用いて同様の免疫蛍光染色を行った結果である。この場合には 2 次抗体として上述のようにウサギ抗 cp3 抗体を、3 次抗体として Cyanin3 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体（Jackson Immuno Research Laboratories）を用いた。矢印 B で示した部分に蛍光が観察される。尚、矢印 D で示した部分には DAPI による蛍光が観察される。

図 16 の a との比較より、cp3 融合型 scFv-CL 抗体よりも GFP 融合型 scFv-CL 抗体を用いた方が感度及び解像度の点から優れていることがわかった。尚、cp3 融合型 scFv-CL 抗体を用いた場合の染色像の観測には、フィルターセット No.15（励起フィルター BP456/12、ダイクロイックミラー FT580、バリアフィルター LP590）（Zeiss 社製）を用いた。また、GFP 融合型の場合と同様に DAPI による DNA 染色を同時に行った。

本実施例の方法では、5. の「ScFv-CL 抗体ライブラリーから特定の抗原に特異

的に結合するファージの選択」を約2週間で行うことができた。また、6. の「cp3
融合型 scFv-CL 抗体から GFP 融合型 scFv-CL 抗体への変換」から7. の「大腸菌内
での GFP 融合型 scFv-CL 抗体の产生」までを約1週間で行うことができた。した
がって、最終形態の GFP 融合型 scFv-CL 抗体を単離するのに1ヶ月を要しないこ
5 ととなる。このように、本発明の方法によれば極めて短期間で蛍光タンパク質を
融合した scFv 型の抗体を取得することが可能である。なお、蛍光タンパク質を融
合した scFv 型の抗体作製に要する期間は、実験環境によってさらに短縮すること
ができるものである。

この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるもので
10 はない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想定できる範囲で種々
の変形態様もこの発明に含まれる。

産業上の利用の可能性

本発明により、蛍光タンパク質を融合した scFv 型の抗体の新規な作製方法が提
15 供される。本発明の作製方法によれば、極めて短期間で所望の抗体を得ることが
できる。scFv 抗体ライブラリーとして、生体内の多様性を包含するのに十分なク
ローン数を有するものを用いることにより、多種多様な抗体を認識可能な抗体が
得られる。

また、本発明で得られる蛍光タンパク質を融合した scFv 型抗体は、特定波長の
20 光の照射によりそれ自体で蛍光を発するため、検出に2次抗体、3次抗体等を必
要としない。したがって、本発明で得られる抗体を免疫学的測定方法に利用した
場合には、操作工程の簡略化、及び測定時間の短縮化が図れる。また、一般的な
酵素免疫測定法では検出（測定）に特別の試薬（基質）を必要とするが、本発明
で得られる抗体では特定波長の光の照射のみで検出が可能となるため、生細胞内
25 ないし生体内において直接検出することができる。

また、異なる抗原に対して、異なる蛍光タンパク質を融合した抗体を作製し、これらを同時に用いて免疫染色することにより、同時に多色染色することが可能である。

さらに、イントラボディー技術と組み合わせることにより、生細胞内ないし生体内において特定の機能に関与する抗原分子をリアルタイムに測定することが可能となる。
5

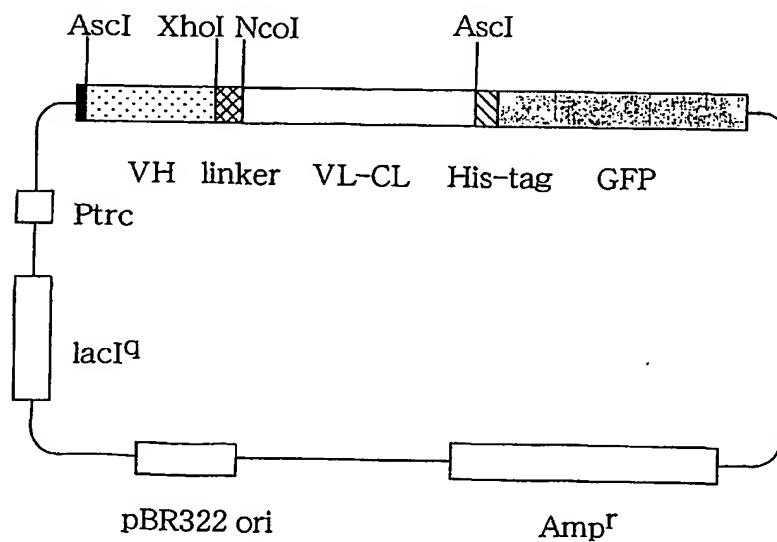
以上のように、本発明により得られる蛍光タンパクと融合した scFv 型抗体は、免疫染色の分野において用途の広い検出試薬に利用できるといえる。

請求の範囲

1. 以下の工程を含む、蛍光タンパク質を融合した scFv 抗体の作製方法。
 - 1) scFv 抗体をその表面に発現しているファージクローンにより構成される scFv 抗体ライブラリーを調製する工程、
 - 5 2) 前記 scFv 抗体ライブラリーを抗原でスクリーニングすることにより、該抗原に結合可能な scFv 抗体を発現しているファージクローンを選択する工程、
 - 3) 工程 2) で選択したファージクローンより、scFv 抗体をコードする遺伝子を取得する工程、
 - 4) 工程 3) で取得した遺伝子を組込むことにより該遺伝子の発現産物と蛍光 10 タンパク質との融合タンパク質を発現可能な発現ベクターに、該遺伝子を組込む工程、及び
 - 5) 工程 4) で得られた組換えベクターを用いて宿主を形質転換し、前記融合タンパク質を発現させる工程。
2. 前記 scFv 抗体ライブラリーは、重鎖可変領域と機能的なコンフォーメーションを再構成するように選択された軽鎖可変領域を少なくとも一部分含んで成る、 15 ことを特徴とする請求の範囲第 1 項に記載の scFv 抗体の作製方法。
3. 前記 scFv 抗体ライブラリーを構成する各ファージクローン表面の scFv 抗体は、VH 領域、VL 領域、リンカー及び CL 領域を有する、ことを特徴とする請求の範囲第 1 項又は第 2 項に記載の scFv 抗体の作製方法。 20
4. 前記蛍光タンパク質は、GFP、RFP、BFP、YFP、CFP 及びこれらの変異体の中から選択される 1 又は 2 以上の蛍光タンパク質である、ことを特徴とする請求の範囲第 1 項乃至第 3 項のいずれかに記載の scFv 抗体の作製方法。
5. 請求の範囲第 1 項乃至第 4 項のいずれかに記載の方法により作製される、蛍光タンパク質を融合した scFv 抗体。 25
6. VH 領域、VL 領域、及びリンカーにより構成される Fv 領域、CL 領域、並びに

該 Fv 領域に該 CL 領域を介して連結される蛍光タンパク質を有してなる、ことを特徴とする蛍光タンパク質を融合した scFv 抗体。

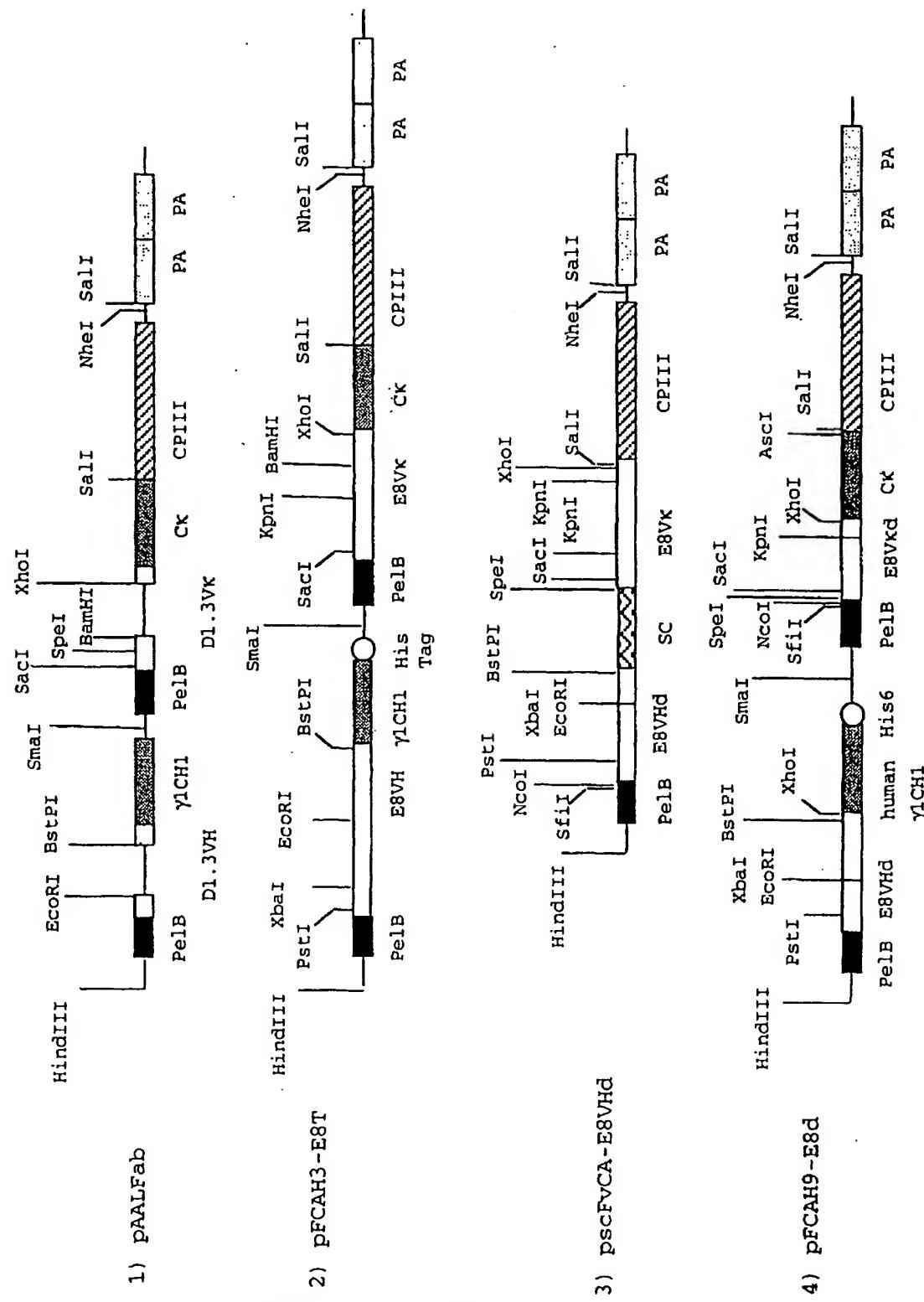
7. 前記蛍光タンパク質は、 GFP、RFP、BFP、YFP、CFP 及びこれらの変異体の中から選択される 1 又は 2 以上の蛍光タンパク質である、ことを特徴とする請求の範囲第 6 項に記載の scFv 抗体。
8. 請求の範囲第 5 項乃至第 7 項のいずれかに記載の scFv 抗体を用いた免疫学的測定方法。
9. 請求の範囲第 1 項に記載の工程 1) ~ 4) により取得される、scFv 抗体遺伝子、及び蛍光タンパク質をコードする塩基配列を有する組換えベクター。
10. 10. 前記 scFv 抗体遺伝子は VH 遺伝子、リンカー配列、VL 遺伝子、及び CL 遺伝子からなる、ことを特徴とする、請求の範囲第 9 項に記載の組換えベクター。
11. 前記蛍光タンパク質は、 GFP、RFP、BFP、YFP、CFP 及びこれらの変異体の中から選択される 1 又は 2 以上の蛍光タンパク質である、ことを特徴とする請求の範囲第 9 項又は第 10 項に記載の組換えベクター。
15. 12. 以下の構造を有する組み換えベクター。



13. 5' 側より順に、開始コドン、scFv 抗体遺伝子を導入する部位、及び蛍光タンパク質をコードする塩基配列を有する発現ベクター。
14. 前記 scFv 抗体遺伝子は、VH 遺伝子、リンカー配列、VL 遺伝子、及び CL 遺伝子からなる、ことを特徴とする請求の範囲第 13 項に記載の発現ベクター。
- 5 15. 前記 scFv 抗体遺伝子を導入する部位と前記蛍光タンパク質をコードする塩基配列との間に His-tag、myc-tag、又は HA-tag をコードする塩基配列を有する、ことを特徴とする請求の範囲第 13 項又は第 14 項に記載の発現ベクター。
16. 前記蛍光タンパク質は、GFP、RFP、BFP、YFP、CFP 及びこれらの中から選択される 1 又は 2 以上の蛍光タンパク質である、ことを
- 10 特徴とする請求の範囲第 13 項乃至第 15 項のいずれかに記載の発現ベクター。
17. scFv 抗体をその表面に発現しているファージクローンにより構成される scFv 抗体ライブラリー、及び
- scFv 抗体遺伝子を組み込むことにより該遺伝子の発現産物と蛍光タンパク質との融合タンパク質を発現可能なベクター、を含む、蛍光タンパク質を融合した
- 15 scFv 抗体作製用キット。
18. 前記 scFv 抗体は VH 領域、VL 領域、リンカー、及び CL 領域から構成される、ことを特徴とする請求の範囲第 17 項に記載のキット。
19. scFv 抗体遺伝子を有するファージクローン又はファージミドクローンから構成される scFv 抗体遺伝子ライブラリー、及び
- 20 scFv 抗体遺伝子を組み込むことにより該遺伝子の発現産物と蛍光タンパク質との融合タンパク質を発現可能なベクター、を含む、蛍光タンパク質を融合した scFv 抗体作製用キット。
20. 前記 scFv 抗体遺伝子は VH 遺伝子、VL 遺伝子、リンカー配列、及び CL 遺伝子から構成される、ことを特徴とする請求の範囲第 19 項に記載のキット。
- 25 21. 前記ベクターは請求の範囲第 13 項乃至第 16 項のいずれかに記載される

発現ベクターである、ことを特徴とする請求の範囲第17項乃至第20項のいずれかに記載のキット。

Fig. 1



満文用語(規則26)

Fig. 2

AAGCTTGCATGCAAATTCTATTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCATCGGCAGCCGCTGGAA
TTGTTATTACTCGTGCACCCAACCAGCGATGGCCCAGGTGCAGCTGCAGCTGGGAGCTTGTAAG
CCAGGGGCTCAGTCAGTTGTCTGCACAGCTCTGGCTAACATTAAAGACACTATATGCACTGGGTG
AAGCAGAGGCTGAAAAGGGTCTAGAATTCCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTATTACTGTGCTGGTTA
TGATTACGGCAACTTGTACTACTGGGCAAGGCACCAGGTACCGTCTCGAGGCCCTCCACCAAGGGCC
ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGGCCCTGGCTGGCTCAA
GGACTACTTCCCCGAACGGTGAAGGTGCTGGAACTCAGGCCCTGACCAAGCGCGTGCACACCTTCCC
GGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGGCTGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGAC
CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATACAAGCCAGCAACACCAAGGTGACAAGAAAGTTGACGCCAAATC
TTGTCATACCATCATCACCATTAATAAGAGCTATCCCGGGAGCTTGCACTGAAATCTATTTCAAGGAGAC
AGTCATAATGAAATACCTATTGCTTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCATGGC
CACTAGTGACATCGAGCTCACCCAGTCTCAGGCTCCCTTCTGCGTCTGTGGGAGAACTGTCAACCATCAC
ATGTCAGCAAGTGGAAATTCAAAATTATTAGCATGGTACCAAGCTGAGATCAAACGGCTGATGCTG
CACCAACTGTATCCATCTCCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGCTTCT
TGAACAGCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCTCC
TGAACAGTGGACTGATCAGGACGAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCTCACGTTGACCAAGG
ACGAGTATGAAACGACATAACAGCTATACCTGTAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCAACCCATTGCAAGA
GCTTCAACAGGAATGAGTGTGCGCGCCAGTCAGTCCATTGTTGTGAATATCAAGGCCATCGCTG
ACCTGCCAACCTCTGTCAATGCTGGCGGGCTCTGGTGGTGGTCTGGTGGGGCTCTGAGGGTGGT
GCTCTGAGGGTGGCGTCTGAGGGTGGCGCTCTGAGGGAGGGCTTCCGGTGGTGGCTCTGGTTCGGG
ATTTTGATTATGAAAAGATGGCAACGCTAATAAGGGGCTATGACCGAAAATGCCATGAAAACCGCCTAC
AGTCAGACGCTAAAGGCAAATTGATTCTGCTACTGATTACGGTGTCTATGCGATGGTTCAATTGGT
ACGTTTCCGGCTTGTAAATGGTAAATGGTACTGGTATTGCTGGCTCTAATTCCAAATGGCTCAAG
TCGGTACGGTATAATTCACTTAAATGAAATAATTCCGTCAATTTCACCTCCCTCAATCGGTTG
AATGTCGCCCTTTGCTTGGCGCTGGTAAACCATATGAAATTTCATTGATTGTGACAAAATAACCTTAT
TCCGTGGTGTCTTGCTTCTTCTTTATATGTTGCCACCTTATGTTGCTATGTTGCTAACATAC
TGCCTAAAGGAGTCTAATCATGCCAGTTCTGGGTGCTAGCTGCGACTGCCAACACGATGAAAGCC
GTAGACAACAAATTCAACAAAGAACAAACAAAAGCGTTCTATGAGATCTACATTACCTAAACTTAAAGGAA
GAACAAGGAAACGCCCTCATCCAAAGTTAAAGATGCCAACGCCAGCGTAAACCTTTAGCAGAAGCT
AAAAAGCTAAATGATGCTCAGGCCGAAAGTAGACAACAAATTCAACAAAGAACAAACAAAAGCGTTCTAT
GAGATCTTACATTACCTAACTTAAACGAAAGAACACGAAACGCCCTCATCCAAAGTTAAAGATGACCCA
AGCCAACGCTAACCTTTAGCAGAAGCTAAAGCTAAATGATGCTCAGGCCGAAAGTAGACGCCGAAT
TAGCTGGGAAATTATT

3/16

Fig. 3

M K Y L L P T A A A G
AAGCTTGCATGCAAATTCTATTCAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGA
HindIII

L L L L A A Q P A M A Q V Q L Q Q S G A E L V K
TTGTTATTACTCGCTGCCAACAGCGATGGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGCAGAGCTGTGAAG
PstI

P G A S V K L S C T A S G F N I K D T Y M H W V
CCAGGGGCCCTCAGTCAGTTGTCTGCACAGCTCTGGCTCAACATTAAGACACCTATATGCACTGGTG

K Q R P E K G ----- L T S E D T A V Y Y C A G Y
AAGCAGAGGCCCTGAAAAGGGTCTAGAATTCCCTGACATCTGAGGACACTGCCGCTATTACTGTGCTGGTTA
XbaI EcoRI

D Y G N F D Y W G Q G T T V T V S S A S T K G P
TGATTACGGCAACTTGACTACTGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCCC
BstPI XhoI

S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K
ATCGGTCTCCCCCTGGCACCCCTCCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGCGGCCCTGGCTGCCTGGTCAA

D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P
GGACTACTCCCCGAACGGTGACGGTGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCC

A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T
GGCTGTCCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTGGCAC

Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S
CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATC

C H H H H H H * *
TTGTCATCACCACATCATCACCATTAATAAGAGCTATCCCCGGAGCTTGATGCAAATTCTATTCAGGAGAC
SmaI

M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A M A
AGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGC
SfiI NcoI

T S D I E L T Q S P A S L S A S V G E T V T I T
CACTAGTGACATCGAGCTACCCAGTCTCCAGCCTCCCTTCTGCGTCTGGAGAAACTGTCACCATCAC
SpeI SacI

C R A S G N I H N Y L A ----- K L E I K R A D A A
ATGTCGAGCAAGTGGAAATTCAAAATTATTAGCATGGTACCAAGCTCGAGATCAAACGGGCTGATGCTG
KpnI XhoI

4/16

Fig. 4

P T V S I F P P S S E Q L T S G G A S V V C F L
CACCAACTGTATCCATCTTCCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGGTCCTCAGTGTGTGCTCT

N S F Y P K D I N V K W K I D G S E R Q N G V L
TGAACAGCTCTACCCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCCCTC

N S W T D Q D S K D S T Y S M S S T L T L T K D
TGAAACAGTGGACTGATCAGGACAGCAAAGCACCTACAGCATGACCACCCCTCACTTCACCAAC

E Y E R H N S Y T C E A T H K T S T S P I V K S
ACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACTGTGAGGCCACTCAAAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAGA

F N R N E C S A R Q S T P F V C E Y Q G Q S S D
GCTTCAACAGGAATGAGTGTTGGCGCGCCACTGACTCCATTGTTGTGAATATCAAGGCCAATCGCTTC

Ascl *Sal1*

L P Q P P V N A G G G S G G G S G G G S E G G G
ACCTGCCTCAACCTCCGTCAATGCTGGCGCCGGCTCTGGTGGTTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGCTC

S E G G G S E G G G S E G G G G S G G G G S G S G D
GCTCTGAGGGTGGCGGTCTGAGGGTGGCGGTCTGAGGGAGGCCGTTCCGGTGGCTCTGGTTCCCGT

F D Y E K M A N A N K G A M T E N A D E N A L Q
ATTTTGATTATGAAAAGATGGCAAAACGCTAATAAGGGGGTATGACCGAAAAATGCCGTGAAACGCCCTAC

S D A K G K L D S V A T D Y G A A I D G F I G D
AGTCAGACGCTAAAGGCAAATCTGATTCTGTGCGTACTGATTACGGTGCTATCGATGGTTTCATTCGTC

V S G L A N G N G A T G D F A G S N S Q M A Q V
ACGTTTCCGGCTTGCTAATGGTAATGGCTACTGGTGTATTTCGCTGCTAAATTCCAAATGGCTAACG

G D G D N S P L M N N F R Q Y L P S L P Q S V E
TCGGTGCAGGTGATAATTACCTTAATGAATAATTCCCGTCAATTACCTCCCTCCCTCAATCGTTG

C R P F V F G A G K P Y E F S I D C D K I N L F
AATGTCGCCCTTGTCTTGCGCTGGTAAACCATATGAATTTCATTGATGTGACAAAAATAAACTTAT

R G V F A F L L Y V A T F M Y V F S T F A N I L
TCCGTGGTGCTTGCGTTCTTATATGTTGCCACCTTATGTATGTATTTCACGGTTGCTAACATAC

R N K E S * S T A Q H D E A
 TGCGTAATAAGGAGTCTTAATCATGCCAGTTCTTTGGGTGCTAGCTGCGACTGCCAACACGATGAAGCC

V D N K F N K E Q Q N A F Y E I L H L P N L N E
GTAGACAACAAATTCAACAAAGAACACAAAACGCGTTCTATGAGATCTTACATTACCTAACTTAAACGAA

GAACAA CGAAC GCGCTTCATCCAAAGTTAAAAGATGACCCAAAGCGCTAACCTTTAGCAGAAGCT

AAAAAGCTAAATGATGCTAGGGCCGAAAGTAGACAACAAATTCAACAAAGAACAAACAAAACGCGTTCTAT

5/16

Fig. 5

E I L H L P N L N E E Q R N A F I Q S L K D D P
GAGATCTTACATTTACCTAACCTAAACGAAGAACACGAAACGCCCTCATCCAAAGTTAAAAGATGACCCA

S Q S A N L L A E A K K L N D A Q A P K V D A N
AGCCAAGCGCTAACCTTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAATGATGCTCAGGCGCCGAAAGTAGACGCGAAT

*
TAGCTGGAAATTAAATTC

6/16

F i g . 6

AAGCTTGCATGCAAATTCTATTCAGGAGACAGTCATAATGAAAATACCTATTGCCAACGGCAGCCGCTGGA
TTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGCCATGGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGCAGAGCTTGTGAAG
CCAGGGCCTCAGTCAGTTGTCTGCACAGCTCTGGCTCAACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGT
AAGCAGAGCCTGAAAGGGTCTAGAATTCCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTGGTTA
TGATTACGGCAACTTTGACTACTGGGCAAGGCACCACGGTCAACGGTCTCCAGGGCGTGGCGGATCAGG
TGGCGGTGGAAGTGGCGTGGTGGTCACTAGTGCACATGGCTCACCCAGTCTCAGGCCTCCCTTCTGC
GTCTGTGGAGAAACTGTCACCATCACATGTCAGCAAGTGGAAATTACAATTATTTAGCATGGTACCA
GCAGAAACAGGAAATCTCCTCAGCTCTGGTCTATAATGCAAAACCTTAGCAGATGGTGTGCCATCAAG
GTTCACTGGCACTGGATCCGGAACACAATTCTCTCAAGATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTGGGAG
TTATTACTGTCACATTTTGGAGTACTCCGTGGACGTTGGAGGTACCAAGCTCGAGTCAGTCACTCATT
CGTTGTGATAATCAAGGCAATCGTCTGACCTGCCAACCTCTGTCAATGCTGGCGGCTCTGGTGG
TGGTTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGAGG
CGGTTCCGGTGGTGGCTCTGGTCCGGTGAATTGATTATGAAAAGATGGCAACGCTAATAAGGGGCTAT
GACCGAAAATGCCGATGAAAACGGCTACAGTCAGACGCTAAAGGCAAACCTGATTCTGCTACTGATT
CGGTGCTGCTATCGATGGTTCATGGTGACGTTCCGGCTTCTGTAATGGTAATGGTACTGGTATT
TGCTGGCTCAATTCCCAAATGGCTCAAGTCGGTGACGGTATAATTACCTTTAATGAAATAATTCCGTCA
ATATTACCTCCCTCCCTCAATGGTGAATGCGCCCTTGTCTTGGCGCTGGTAAACCATATGAATT
TTCTATTGATTGTGACAAAATAACCTTATCCGTGGTCTTGTGCTTCTTATATGTTGCCACCTTAT
GTATGTTTCTACGTTGCTAACATACTGCGTAATAAGGACTCTTAATCATGCCAGTTCTTGGTGCT
AGCTGTCGACTGCGCAACACGATGAAGCGTAGACAACAAATTCAACAAAGAACAAACAAACGCGTCTATG
AGATCTTACATTACCTAACCTAAACGAAGAACGAAACGAAACGCTTCACTCAAAGTTAAAAGATGACCCAA
CCCCAAAGCGCTAACCTTTAGCAGAAGCTAAATGATGCTCAGGCCTGAAAGTAGAACACAAAT
GAGATCTAACATTACCTAACCTAAAGAAGAACACGAAACGCTTCACTCAAAGTTAAAAGATGACCCAA
TCAACAAAGAACAAACAAACGCGTTCTATAGCCAAGCGCTAACCTTTAGCAGAAGCTAAAAGCTAAATG
ATGCTCAGGCCTGAAAGTAGACCGAATTAGCTGGAAATTCA

7/16

Fig. 7

M K Y L L P T A A A G
AAGCTTGCATGCAAATTCTATTCAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGA
HindIII

L L L L A A Q P A M A Q V Q L Q Q S G A E L V K
TTGTTATTACTCGCGGCCAGCCCATGGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGCAGAGCTGTGAAG
SfiI *NcoI* *PstI*

P G A S V K L S C T A S G F N I K D T Y M H W V
CCAGGGCCTCAGTCAGTTGTCTGCACAGCTCTGGCTCAACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGTG

K Q R P E K G ----- L T S E D T A V Y Y C A G Y
AAGCAGAGGCCTGAAAAGGGTCTAGAATTCCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCATTACTGTGCTGGTTA

XbaI *EcoRI*

D Y G N F D Y W G Q G T T V T V S S S G G G G S G
TGATTACGGCAACTTGACTACTGGGCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCCTCAGGCGTGGCGGATCAGG

*Bst*PI

G G G S G G G S T S D I E L T Q S P A S L S A
TGGCGGTGGAAGTGGCGGTGGTGGTCTACTAGTGACATCGAGCTCACCCAGTCTCCAGCCTCCCTTTCTGC

SpeI *SacI*

S V G E T V T I T C R A S G N I H N Y L A W Y Q
GTCTGTGGAGAAACTGTCACCATCACATGTCGAGCAAGTGGGAATTACACAATTATTTAGCATGGTACCA

KpnI

Q K P G K S P Q L L V Y N A K T L A D G V P S R
GCAGAAACCAGGGAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATAATGCAAAACCTTAGCAGATGGTGTGCCATCAAG

F S G S G S G T Q Y S L K I N S L Q P E D F G S
GTTCAGTCAGTGGCAGTGGATCCGGAACACAATATTCTCTCAAGATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTGGGAG

BamHI

Y Y C Q H F W S T P W T F G G G T K I E S T P F
TTATTACTGTCACATTTGGAGTACTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGTACCAAGCTCGAGTCGACTCCATT

KpnI *XhoI* *SalI*

V C E Y Q G Q S S D L P Q P P V N A G G G S G G
CGTTTGTAATATCAAGGCCAATCGTCTGACCTGCCCAACCTCCTGTCATGCTGGCGGCGCTCTGGTGG

G S G G G S E G G G S E G G G S E G G G S E G G
TGGTTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGAGG

G S G G G S G S G D F D Y E K M A N A N K G A M
CGGTTCCGGTGGCTGCTGGTCCGGTGATTTGATTATGAAAAGATGGCAAACGCTAATAAGGGGCTAT

T E N A D E N A L Q S D A K G K L D S V A T D Y
GACCGAAAATGCCGATGAAAACGCGCTACAGTCAGACGCTAAAGGCAAACCTGATTCTGTCGCTACTGATTA

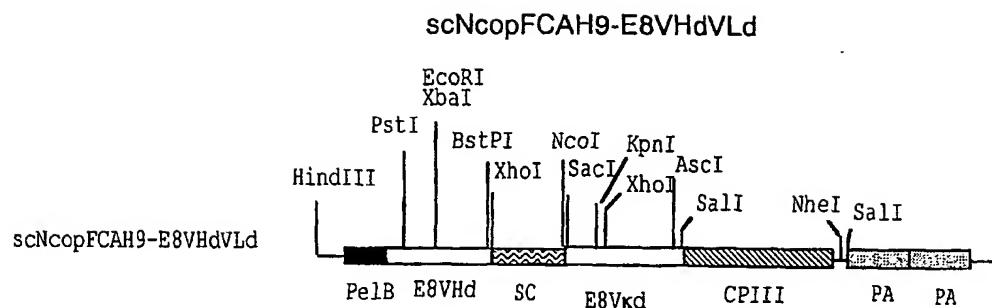
8/16

Fig. 8

G A A I D G F I G D V S G L A N G N G A T G D F
 CGGTGCTGCTATCGATGGTTTCATTGGTGACGTTCCGGCCTGCTAATGGTAATGGTGCTACTGGTGA
 A G S N S Q M A Q V G D G D N S P L M N N F R Q
 TGCTGGCTCTAATTCCCAAATGGCTCAAGTCGGTGACGGTGATAATTACCTTAATGAATAATTCCGTCA
 Y L P S L P Q S V E C R P F V F G A G K P Y E F
 ATATTTACCTTCCCTCCCTCAATCGTTGAATGTCGCCCTTTGCTTTGGCGCTGGTAAACCATATGAATT
 S I D C D K I N L F R G V F A F L L Y V A T F M
 TTCTATTGATTGTGACAAAATAAACTTATTCCGTGGTGTCTTGCGTTCTTTATATGTTGCCACCTTAT
 Y V F S T F A N I L R N K E S *
 GTATGTATTTCTACGTTGCTAACATACTCGCTAATAAGGAGTCTTAATGCCAGTTCTTGCGT
NheI
 S T A Q H D E A V D N K F N K E Q Q N A F Y E
AGCTGTCGACTCGCAACACGATGAAGCCGTAGACAACAAATTCAACAAAGAACACAAAACGCCTCATG
Sall
 I L H L P N L N E E Q R N A F I Q S L K D D P S
 AGATCTTACATTACCTAACCTAAACGAAGAACACGAAACGCCCTCATCCAAAGTTAAAAGATGACCCAA
 Q S A N L L A E A . K K L N D A Q A P K V D N K F
 GCCAAAGCGCTAACCTTTAGCAGAAGCTAAATGATGCTCAGGCGCCAAAGTAGACAACAAAT
 N K E Q Q N A F Y E I L H L P N L N E E Q R N A
 GAGATCTTACATTACCTAACCTAAACGAAGAACACGAAACGCCCTCATCCAAAGTTAAAAGATGACCCAA
 F I Q S L K D D P S Q S A N L L A E A K K L N D
 TCAACAAAGAACACAAAACCGCTCTATAGCAAAGCGCTAACCTTTAGCAGAAGCTAAAAGCTAAATG
 A Q A P K V D A N *
 ATGCTCAGGCGCCGAAGTAGACCGAATTAGCTGGAAATTAAATTC

9/16

Fig. 9

**BEST AVAILABLE COPY**

10/16

Fig. 10

M K Y L L P T A A A G
AAGCTTGATGCAAATTCTATTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCACGGCAGCCGCTGGAA
HindIII
 L L L L A A Q P A M A Q V Q L Q Q S G A E L V K
 TTGTTATTACTCGCTGCCAAC~~CAGCGATGGCC~~AGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAG
PstI
 P G A S V K L S C T A S G F N I K D T Y M H W V
 CCAGGGGCTCAGTCAGTCAAGTGTCTGCACAGCTCTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGTG
 K Q R P E K G ----- L T S E D T A V Y Y C A G Y
 AAGCAGAGGCCTGAAAAGGGTCTAGAATTCCCTGACATCTGAGGAACTGCCGTCTATTACTGTGCTGGTTA
XbaI EcoRI
 D Y G N F D Y W G Q G T T V T V S S G G G G S G
 TGATTACGGCAACTTGACTACTGGGGCAAGGACCACGGTCACCGTCTCGAGAGGGCGTGGCGGATCAGG
BstPI XhoI
 G G G S G G G G S M A
 TGGCGGTGGAAGTGGCGGTGGTGGTCCCATGGCC
NcoI
 D I E L T Q S P A S L S A S V G E T V T I T
 GACATCGAGCTACCCAGTCTCCAGCCTCCCTTCTGCTCTGTGGGAGAAACTGTCACCATCAC
SacI
 C R A S G N I H N Y L A ----- K L E I K R A D A A
 ATGTCGAGCAAGTGGGAATATTCAAATTAGCATGGTACCAAGCTCGAGATCAAACGGGCTGATGCTG
KpnI XhoI
 P T V S I F P P S S E Q L T S G G G A S V V C F L
 CACCAACTGTATCCATTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTCT
 N S F Y P K D I N V K W K I D G S E R Q N G V L
 TGAACAGCTTCTACCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAATGGCGTCC
 N S W T D Q D S K D S T Y S M S S T L T L T K D
 TGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCTCACGTTGACCAAGG

11/16

Fig. 11

E Y E R H N S Y T C E A T H K T S T S P I V K S
ACGAGTATGAACGACATAACAGCTACCTGTGAGGCCACTACAAGACATCAACTCACCCATTGTCAGA

F N R N E C S A R Q S T P F V C E Y Q G Q S S D
GCTTCAACAGGAATGAGTGGCGCCAGTCGACTCCATTGTTGTGAATATCAAGGCCAATCGCTG
AspI SalI
L P Q P P V N A G G G S G G G S G G G S E G G G
ACCTGCCTCAACCTCTGTCAATGCTGGCGGGCTCTGGTGGTGGTCTGGTGGCGCTCTGAGGGTGGTG

S E G G G S E G G G S E G G G S G G G S G S G D
GCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGCTCTGAGGGAGGCCGTTCCGGTGGCTCTGGTCCGGT

F D Y E K M A N A N K G A M T E N A D E N A L Q
ATTTGATTATGAAAGATGGCAAACGCTAATAAGGGGCTATGACCAAAATGCCATGAAAACGCGCTAC

S D A K G K L D S V A T D Y G A A I D G F I G D
AGTCAGACGCTAAAGGCAAACTGTGATTCTGTCGCTACTGATTACGGTGTGCTATCGATGGTTCAATTGGTG

V S G L A N G N G A T G D F A G S N S Q M A Q V
ACGTTTCCGGCCTGCTAATGTAATGGTGTACTGGTATTGCTGGCTCAATTCCAAATGGCTCAAG

G D G D N S P L M N N F R Q Y L P S L P Q S V E
TCGGTACGGTATAATTCACTTAAATGAATAATTCCGTAATATTACCTCCCTCAATCGGTTG

C R P F V F G A G K P Y E F S I D C D K I N L F
AATGTCGCCCTTGTCTTGGCGCTGGTAAACCATATGAATTCTATTGATTGTGACAAAATAACTTAT

R G V F A F L L Y V A T F M Y V F S T F A N I L
TCCGTGGTGTCTTGCCTTATATGTTGCCACCTTATGTATGTTACGTTGCTAACATAC

R N K E S * S T A Q H D E A
TGCATAAAGGAGTCTTAATCATGCCAGTTCTTGGGTGCTAGCTGCAGTGCGCAACACGATGAAGCC
NheI SalI
V D N K F N K E Q Q N A F Y E I L H L P N L N E
GTAGACAACAAATTCAACAAAGAACAAACGGTCTATGAGATCTAACATTACACTAAACGAA

E Q R N A F I Q S L K D D P S Q S A N L L A E A
GAACAAACGAAACGCCCTCATCCAAAGTTAAAGATGCCAACGCCAACGCTAACCTTAGCAGAACGCT

K K L N D A Q A P K V D N K F N K E Q Q N A F Y
AAAAAGCTAAATGATGCTCAGGCCCGAAGTAGACAACAAATTCAACAAAGAACAAACGGTCTAT

E I L H L P N L N E E Q R N A F I Q S L K D D P
GAGATCTTACATTACCTAAACTAAACGAAGAACAAACGAAACGCCCTCATCCAAAGTTAAAGATGCCAAC

S Q S A N L L A E A K K L N D A Q A P K V D A N
AGCCAACGGCTAACCTTAGCAGAGTAAAGCTAAATGATGCTCAGGCCCGAAAGTAGACGCGAAT

12/16

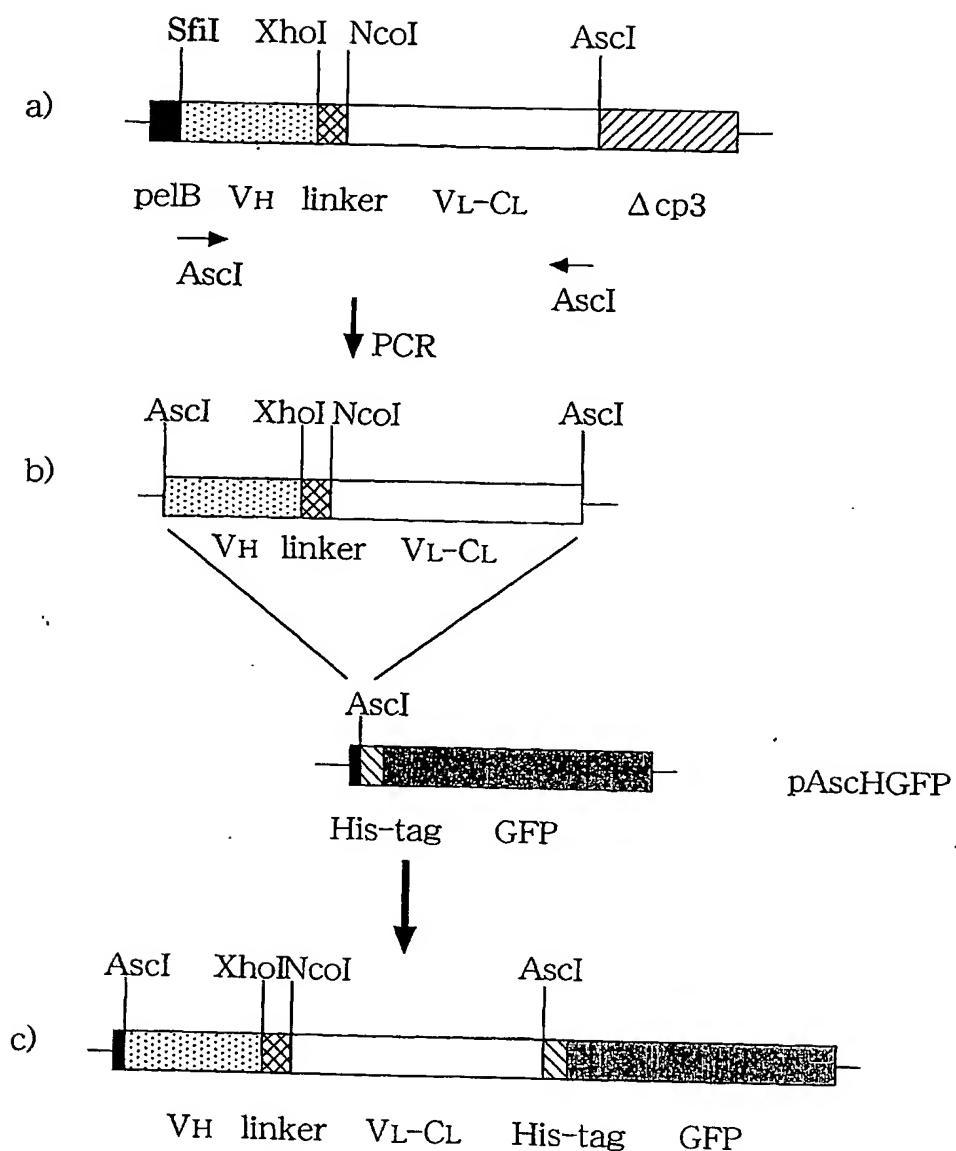
F i g. 1 2

*

TAGCTGGAAATTAAATTG

13/16

Fig. 13



BEST AVAILABLE COPY

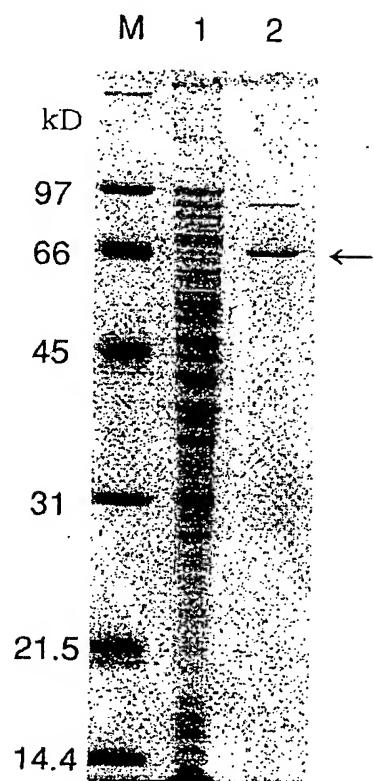
14/16

Fig. 14

差營之用紙(規則26)

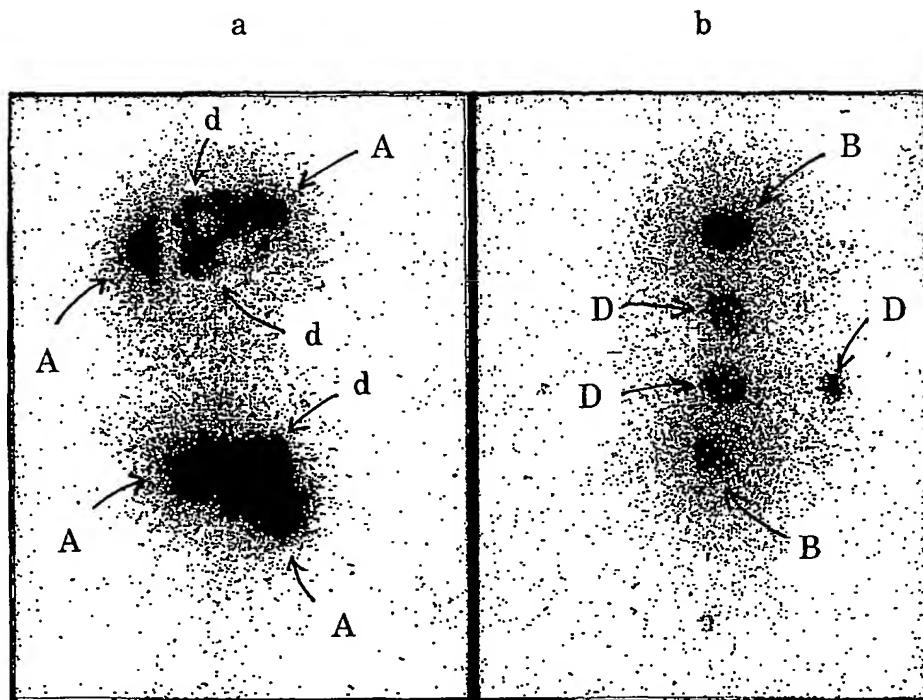
15/16

F i g. 1 5



16/16

Fig. 16



1/21

SEQUENCE LISTING

<110> MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.

Morino, Kazuhiko
Akahori, Yasushi
Iba, Yoshitaka
Shinohara, Midori
Ukai, Yoshinori
Kurosawa, Yoshikazu

<120> Method for producing fluorescent scFv antibody

<130> P020201

<140>
<141>

<150> JP P2000-178880

<151> 2000-06-14

<160> 66

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

2/21

Leu Gin Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Pro Ser Gly Ser Phe Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

〈210〉 2

<211> 17

<212> DNA

〈213〉 Artificial Sequence

220

**<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence**

〈400〉 2

caggaaacag ctatgac

17

〈210〉 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

220

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 3

cggctccaag tcgacgtcgta

22

〈210〉 4

<211> 83

<212> DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

220

〈223〉 Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

3/21

<400> 4

cagctgcagc agtctggggc agagcttgtg aagccagggg cctcagtcaa gttgtccigc 60
acagcttcig gcttcaacat taa 83

<210> 5

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 5

agaccgaagt tgtaatttct gtggatatac gtgacccact tcgtctccgg acttttccca 60
gatctcacct aaccttccta a 81

<210> 6

<211> 84

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

aagggtctag agtggattgg aaggattgat cctgcgagtg gtaatactaa atatgacccg 60
aaggacaagg ccactataac agca 84

<210> 7

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 7

ttcctgttcc ggtgatattg tcgtctgtt aggagggtgt gtcggatgga tgtcgactta 60
agggac 66

<210> 8
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 8
cagctgaatt ccctgacatc tgaggacact gccgtctatt actgtgctgg t 51

<210> 9
<211> 73
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 9
cagataatga cacgaccaat actaatgccg ttgaaactga tgaccccggt tccgtggtgc 60
cagttggcaca agg 73

<210> 10
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 10
ggttctctaa cagtagtggt agtagtgta attattctcg atagggccct cgaa 54

<210> 11
<211> 69
<212> DNA

5/21

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 11

gacatcgagc tcacccagtc tccagccctcc ctttctgcgt ctgtgggaga aactgtcacc 60
atcacatgt 69

<210> 12

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 12

tgacagtgtt agtgtacagc tcgttcaccc ttataagtgt taataaatcg taccatggc 60
gtc 63

<210> 13

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 13

gcatggtaacc agcagaaacc aggaaaatct cctcagctcc tggtctat 48

<210> 14

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

6/21

Synthesized Primer Sequence

<400> 14

ggagtgcgagg accagatatt acgttttgg aatcgctac cacacggtag ttccaagtca 60
ccgtcaccta ggccttgtt t 81

<210> 15

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 15

tcatgaggca cctgcaagcc acctccgtgg ttcgagctct agttt 45

<210> 16

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 16

agtactccgt ggacgttcgg tggaggcacc aagctcgaga tcaaa 45

<210> 17

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 17

atcgacagct 10

7/21

<210> 18
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 18
aagccaccc catggttcga gctcttagttt

30

<210> 19
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 19
tcgaaggtgt ccttactcac aagccgcgca gtcagctgag gttaa

44

<210> 20
<211> 55
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 20
accctggtca ccgtctccctc agccctccacc aaggggccat cggctttccc cctgg

55

<210> 21
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

8/21

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 21

gggagtcgtc gcagcactgg cacgggaggc cgtcgaa

37

<210> 22

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 22

ggactctact ccctcagcag cgtcgtagcc gtgcc

36

<210> 23

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 23

gggtcggtgt ggttccacct gtttttcaa ctccggttta gaacagtatgt ggttagtagtg 60
gta 63

<210> 24

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 24

9/21

gggtttagaa cagtagtgtt agtagtgta attattctcg atagggccct cgaacg 56

<210> 25

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 25

ggcaccacgg tcacccgttc gagccctcc acc

33

<210> 26

<211> 91

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 26

caccacggtc accgtctccct caggcggtgg cggatcagggt ggcggtgaa gtggcggtgg 60
tgggtctact agtgacatcg agctcaccca g 91

<210> 27

<211> 91

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 27

gtggtgccag tggcagagga gtccgccacc gcctagtcca ccggcacctt caccggcacc 60
acccagatga tcactgtgc tcgagtgggt c 91

<210> 28

10/21

<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 28
caggaaacag ctatgac

17

<210> 29
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 29
gacgcgggt cggccggta cggctccaag tcgacgtcgta

42

<210> 30
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 30
gtccctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcccacatcc agatgaccca gtctcc 56

<210> 31
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

11/21

Synthesized Primer Sequence

<400> 31

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccgatgtt tgatgactca gtctcc 56

<210> 32

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 32

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccgaaattt ttttgacgca gtctcc 56

<210> 33

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 33

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccgacatcg tgatgaccga gtctcc 56

<210> 34

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 34

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccgaaacga cactcacgca gtctcc 56

12/21

<210> 35
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 35
gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccgaaattg tgctgactca gtctcc 56

<210> 36
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 36
gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcccagtctg ttttacgca gcccgc 56

<210> 37
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 37
gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcccagtctg ccctgactca gcccgc 56

<210> 38
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

13/21

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 38

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcctcctatg tgctgactca gccacc 56

<210> 39

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 39

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcctcttctg agctgactca ggaccc 56

<210> 40

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 40

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcccacgtt tactgactca accgcc 56

<210> 41

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 41

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcccaggctg tgctcacica gcccgc 56

<210> 42
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 42
gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccaattttt tgctgactca gccccca 56

<210> 43
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 43
tcgactggcg cgccgaacac tctccctgt tgaagctctt tgtg 44

<210> 44
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 44
tcgactggcg cgccgaacat tctgttaggg ccactgtctt ctc 43

<210> 45
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

15/21

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 45

atataaga gctatccgg

20

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 46

atggagtcgg gaaggaagt

20

<210> 47

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 47

gtccctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcccagggtgc agctggtgca gtctgg

56

<210> 48

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 48

gtccctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcccagggtca acttaaggga gtctgg

56

<210> 49
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 49
gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcccagggtgc agctggtgga gtctgg 56

<210> 50
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 50
gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcccagggtgc agctgcagga gtcggg 56

<210> 51
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 51
gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcccagggtgc agctgttgtca gtctgc 56

<210> 52
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 52

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcccaggtac agctgcagca gtcagg 56

<210> 53

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 53

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcccagrtca cttgaagga gtctggtcc 59

<210> 54

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 54

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcccaggtgc agctacagca gtgggg 56

<210> 55

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 55

18/21

gcccccgcaa ctgcggccca gccggccatg gccgagggtgc agctggtgca gtctgg 56

<210> 56

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 56

gcccccgcaa ctgcggccca gccggccatg gcccaggtgc agctggtgca atctgggtct 60
gagt 64

<210> 57

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 57

ggtgtggaggca ctcgagacgg tgaccagggt gc 32

<210> 58

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 58

ggtgtggaggca ctcgagacgg tgaccattgt cc

32

<210> 59

<211> 32

19/21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 59

ggtaggaggca ctcgagacgg tgaccagggt tc

32

<210> 60

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 60

ggtaggaggca ctcgagacgg tgaccgttgt cc

32

<210> 61

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 61

gtcaccgtct cgagaggcgg tggcgatca ggtggcggtg gaagtggcgg tggtgggtcc 60
atggccgaca tcgagct

77

<210> 62

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

20/21

Synthesized Primer Sequence

<400> 62
cgatgtcggc catggaccca ccaccgccac ttccaccgccc acctgtatccg ccaccgcctc 60
tcgagacg 68

<210> 63
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 63
taggcgcgcc aggggggttc tcatacat 27

<210> 64
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 64
aaggcgcgcc atggtttatt cctcctt 27

<210> 65
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 65
aaggcgcgcc aggtgcagct ggtggagct g 31

<210> 66
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 66
gtcgactggc gcgcc

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/04964

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K16/00, C12N15/09 // C12P21/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K16/00, C12N15/09, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX PY	Joanne L. Casey et al., "Green fluorescent antibodies: novel in vitro tools", Protein Engineering, June, 2000, Vol.13, No.6, pages 445 to 452	5-16 1-4, 17-21
Y	WO 95/25167 A1 (Merck Patent Gesellschaft mit Beschränkter Haftung), 21 September, 1995 (21.09.95), & US 5844093 A & JP 8-510952 A	1-21
X Y	Georges Schwobach et al., "Protein of Fluorescent Single-Chain Antibody Fragments in Escherichia coli", Protein Expression and Purification, March, 2000, Vol.18, No.2, pages 121 to 132	5-16 1-4, 17-21
X Y	Mark A. Hink et al., "Structural Dynamics of Green Fluorescent Protein Alone and Fused with a Single Chain Fv Protein", The Journal of Biological Chemistry, June, 2000, Vol.275, No.23, pages 17556 to 17560	5-16 1-4, 17-21
X Y	FR 2778408 A1 (Université Louis Pasteur), 12 November, 1999 (12.11.99) (Family: none)	5-16 1-4, 17-21

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
07 September, 2001 (07.09.01)Date of mailing of the international search report
18 September, 2001 (18.09.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP01/04964

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl' C07K16/00, C12N15/09 // C12P21/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl' C07K16/00, C12N15/09, C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X/ P Y	JOANNE L. Cascy et al. Green fluorescent antibodies:novel <i>in vitro</i> tools. Protein Engineering June 2000, Vol. 13, No. 6, p. 445-452	5-16/ 1-4, 17-21
Y	WO 95/25167 A1 (メルク パテント ケゼルシャフト ミット ヘンケル ハフトング) 21.9月.1995 (21.09.95) & US 5844093 A & JP 8-510952 A	1-21

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.09.01

国際調査報告の発送日

18.09.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915.

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子



4 N

9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C(続き) .	関連すると認められる文献	関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X/ Y	GEORGES Schwoebach et al. Protein of Fluorescent Single-Chain Antibody Fragments in <i>Escherichia coli</i> . Protein Expression and Purification March 2000, Vol. 18, No. 2, p. 121-132	5-16/ 1-4, 17-21
X/ Y	MARK A. Hink et al. Structural Dynamics of Green Fluorescent Protein Alone and Fused with a Single Chain Fv Protein. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY June 2000, Vol. 275, No. 23, p. 17556-17560	5-16/ 1-4, 17-21
X/ Y	FR 2778408 A1 (UNIVERSITE LOUIS PASTEUR) 12.11月.1999 (12.11.99) ファミリーなし	5-16/ 1-4, 17-21

THIS PAGE BLANK (USPTO)